

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Identification des gènes MAGE-A exprimés par les cellules tumorales sur microdamier à ADN

Davril, Caroline

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Identification des gènes *MAGE-A* exprimés par les cellules tumorales sur
microdamier à ADN**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Caroline Davril

Juin 2003

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72..... - Télécopie: + 32(0)81.72.....

E-mail:@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Identification des gènes *MAGE-A* exprimés par les cellules tumorales sur microdamier à ADN

DAVRIL Caroline

Résumé

Les gènes *MAGE-A* encodent des antigènes d'intérêt tout particulier pour une immunothérapie anti-tumorale car ils sont strictement spécifiques des tumeurs et partagés par un grand nombre de tumeurs de types histologiques différents. Ces gènes partagent un taux d'identité très élevé rendant difficile leur discrimination.

Un microdamier à ADN a été conçu afin de discriminer les ADNc des 12 membres de la famille *MAGE-A* amplifiés par PCR avec deux couples d'amorces, l'une pour l'amplification spécifique du gène *MAGE-A3* et l'autre pour l'amplification des autres gènes *MAGE-A*. Un contrôle endogène est également amplifié afin de contrôler le bon déroulement du test. Ce dernier consiste en une rétro-transcription de l'ARN total suivie d'une amplification par PCR et d'une hybridation sur microdamier. Une amplification en présence de nucléotides biotinylés permet la détection des amplicons sur microdamier comprenant 12 sondes capteurs, chacune étant spécifique d'un gène *MAGE-A*. Les hybrides sonde-amplicon sont détectés en colorimétrie par des anticorps anti-biotine marqués à l'or colloïdal.

Les conditions d'hybridation et de détection ont été optimisées afin d'obtenir une discrimination parfaite entre les 12 amplicons *MAGE-A*. Les conditions de PCR ont également été mises au point de manière à détecter de faibles quantités d'ARN et à amplifier les différentes séquences *MAGE-A* avec une efficacité comparable.

Ensuite, la robustesse du test a été évaluée en amplifiant un même ADNc sur 10 appareils PCR différents.

Finalement, le test a été comparé à la méthode de référence basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques. Pour les 5 échantillons de tissus tumoraux testés, des résultats virtuellement identiques ont été obtenus par les deux méthodes. À partir de ces données, la sensibilité et la spécificité du test ont été évaluées. De façon remarquable, le test permet de discriminer les séquences des gènes *MAGE-A3* et *MAGE-A6* identiques à 98%.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2003

Promoteur: J. Remacle

Je remercie tout d'abord le professeur Martine Raes de m'avoir accueillie dans son laboratoire durant ces quelques mois, ainsi que le professeur José Remacle qui m'a permis de réaliser ce travail très intéressant.

Je remercie Nathalie Zammattéo qui m'a patiemment suivie tout au long de ce travail pour son soutien dans les moments de stress, ses nombreuses corrections et sa bonne humeur perpétuelle. Merci à Francis Brasseur pour son accueil chaleureux et les corrections qu'il a gentiment accepté d'apporter à ce travail.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai côtoyées tous les jours au labo et qui m'ont aidée à m'y retrouver, ce qui est loin d'être évident au début. Merci à Valérie, Babeth et Thomas avec qui j'ai souvent partagé la pièce de bioluminescence, pour l'aide précieuse et les conseils qu'ils m'ont apportés. Je remercie Andrée pour sa disponibilité et sa patience pour répondre à toutes mes questions. Merci à Valérie et Christelle dont j'ai régulièrement squatté l'ordinateur. Merci aux personnes que j'ai rencontrées chez EAT, Delphine pour m'avoir appris l'art de l'hybridation et Sandrine pour ses corrections.

Je n'oublie pas, bien entendu les autres mémorants, en particulier ceux avec lesquels j'ai découvert les joies de la fac by night.

Un merci tout particulier à tous mes cokotteurs fac diffusiens qui ont toujours été là pour le meilleur... et pour le pire, il faut bien le dire. Merci Marie pour ton soutien perpétuel et ta patience sans limite, sans oublier le fait que je serais probablement morte de faim à l'heure qu'il est...

Salutation à mes frangins (en vacances les gars). Merci à mes parents de m'avoir soutenue tout au long de mes études, et ce au plus profond de mes états de stress.

1. INTRODUCTION

1.1	ANTIGENES SPECIFIQUES DES TUMEURS HUMAINES	1
1.1.1	Définition d'un antigène reconnu en surface des cellules tumorales	1
1.1.2	Expression de l'antigène au niveau moléculaire	1
1.1.3	Spécificité tumorale des antigènes	2
1.1.4	Antigènes tumoraux partagés.....	2
1.2	LA FAMILLE DES GENES <i>MAGE</i>	3
1.2.1	Antigènes tumoraux partagés.....	3
1.2.2	Gènes <i>MAGE</i> ubiquistes.....	3
1.2.3	Homologie de séquences entre les différentes protéines <i>MAGE</i>	3
1.2.4	Evolution vers une famille à membres multiples.....	4
1.3	LA FAMILLE DES GENES <i>MAGE-A</i> HUMAINS.....	4
1.3.1	Découverte des différents membres de la famille <i>MAGE-A</i>	4
1.3.2	Expression des gènes <i>MAGE-A</i>	4
1.3.3	Structure des gènes <i>MAGE-A</i>	5
1.3.4	Etude de la régulation transcriptionnelle	5
1.4	AUTRES GENES CODANT POUR DES ANTIGENES DE TUMEURS SPECIFIQUES ET PARTAGES.....	6
1.4.1	Les gènes <i>BAGE</i> et <i>GAGE</i>	6
1.4.2	Le gène <i>RAGE</i>	7
1.5	FONCTION DES PROTEINES <i>MAGE</i>	7
1.5.1	Gènes <i>MAGE</i> ubiquistes.....	7
1.5.2	Profil d'expression des gènes <i>MAGE</i> dans les tissus normaux	7
1.6	IMMUNOTHERAPIE DIRIGEE	8
1.6.1	Protéines <i>MAGE</i> ubiquistes	8
1.6.2	Différentes stratégies d'immunothérapie anti-cancéreuse	9
1.6.3	Stratégie de vaccination par injection de peptide antigénique	9
1.7	DÉTECTION DES 12 GÈNES <i>MAGE-A</i>	10
1.7.1	Stratégie développée à Institut Ludwig de Recherche contre le Cancer (LICR).....	10
1.7.2	Stratégie de discrimination sur microdamier à ADN.....	11
1.7.2.1	Les microdamiers à ADN dans l'analyse diagnostique	11
1.7.2.2	Utilisation des microdamiers pour détecter les gènes de la famille <i>MAGE-A</i> ..	13
1.7.2.3	Essai d'une première stratégie.....	13
	Objectifs du mémoire	16

2. MATERIELS ET METHODES

2.1	EXTRACTION D'ARN ET RETROTRANSCRIPTION.....	19
2.1.1	Clones ADNc, lignée cellulaires tumorales et tissus.....	19
2.1.2	Extraction d'ARN et d'ADNg.....	19
2.1.3	Rétrotranscription	19
	Matériel	19
	Méthode.....	20
2.2	REACTION EN CHAÎNE DE LA POLYMERASE (PCR).....	21
2.2.1	Principe	21
2.2.2	Amplification des séquences d'ADNc des gènes <i>MAGE-A</i> par l'utilisation d'amorces spécifiques	22
2.2.3	Amplification des séquences d'ADNc des gènes <i>MAGE-A</i> par une PCR triplex ..	22
2.2.3.1	Matériel	22

2.2.3.2	Méthode.....	23
2.3	ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE.....	25
2.3.1	Principe.....	25
2.3.2	Matériel.....	25
2.3.3	Méthode.....	26
2.3.3.1	Préparation du gel d'agarose 1,3%.....	26
2.3.3.2	Préparation des échantillons.....	26
2.3.3.3	Migration des échantillons.....	26
2.3.3.4	Visualisation des échantillons.....	27
2.4	FABRICATION DES MICRODAMIERS.....	28
2.4.1	Principe.....	28
2.4.2	Matériel.....	28
2.4.3	Méthode.....	29
2.4.3.1	Préparation des solutions de fixation.....	29
2.4.3.2	Fixation proprement dite.....	29
2.4.3.3	Lavages.....	29
2.5	HYBRIDATION SUR MICRODAMIER ET DETECTION EN COLORIMETRIE.....	30
2.5.1	Principe.....	30
2.5.2	Matériel.....	31
2.5.3	Méthode.....	32
2.5.3.1	Préparation du mélange d'hybridation.....	32
2.5.3.2	Hybridation.....	32
2.5.3.3	Révélation des lames.....	32
2.6	NUMERISATION DES DAMIERS.....	33
2.7	QUANTIFICATION/DETECTION DES SIGNAUX.....	33

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1	DESCRIPTION DES CONDITIONS INITIALES.....	35
3.1.1	PCR triplex.....	35
3.1.2	Fabrication microdamier à ADN.....	36
3.2	OPTIMISATION DES CONDITIONS D'HYBRIDATION ET DE DÉTECTION EN COLORIMÉTRIE	36
3.2.1	Conditions expérimentales.....	37
3.2.2	Résultats.....	37
3.3	OPTIMISATION DU NOMBRE DE CYCLES PCR.....	39
3.3.1	Conditions expérimentales.....	39
3.3.2	Résultats.....	39
3.4	OPTIMISATION DE LA CONCENTRATION EN AMORCES DANS LA PCR TRIPLEX.....	39
3.4.1	Conditions expérimentales.....	40
3.4.2	Résultats.....	40
3.5	APPLICATION DES CONDITIONS ACTUELLES A DES LIGNEES CELLULAIRES TUMORALES DE REFERENCE.....	40
3.5.1	Conditions expérimentales.....	40
3.5.2	Résultats.....	41
3.6	AJOUT D'UNE AMORCE SENS SPECIFIQUE <i>MAGE-A11</i>	41
3.6.1	Conditions expérimentales.....	41
3.6.2	Résultats.....	41
3.7	MARQUAGE A LA BIOTINE ET DETERMINATION DE LA LIMITE DE DETECTION.....	42
3.7.1	Conditions expérimentales.....	42
3.7.2	Résultats.....	42

3.8	REPRODUCTIBILITE DU TEST.....	43
3.8.1	<i>Conditions expérimentales</i>	43
3.8.2	<i>Résultats</i>	43
3.9	LIMITE DE DETECTION D'ADNG SUR MICRODAMIER	44
3.9.1	<i>Conditions expérimentales</i>	44
3.9.2	<i>Résultats</i>	45
3.10	ANALYSE COMPARATIVE DE L'EXPRESSION DES GENES <i>MAGE-A</i> DANS DES TISSUS TUMORAUX.....	46
3.10.1	<i>Conditions expérimentales</i>	46
3.10.2	<i>Résultats</i>	46
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	48

4. BIBLIOGRAPHIE

Table des abréviations

A : adénine

Aa : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Ag : argent

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BAGE : B melanoma antigen

C : cytosine

°C : degré Celsius

COS: CV1 Origin defective SV40

CTL : lymphocytes T cytolytiques

dNTP : déoxynucléotide tri-phosphate

dATP : déoxynucléotide adénine tri-phosphate

dCTP : déoxynucléotide cytosine tri-phosphate

dGTP : déoxynucléotide guanine tri-phosphate

DTT : Dithiothréitol

dTTP : déoxynucléotide thymine tri-phosphate

dUTP : déoxynucléotide uracile tri-phosphate

G : guanine

GAGE : G antigen

HLA : Human Leucocyte Antigen

Kb : kilobase

LICR: Ludwig Institute for Cancer Research

MAGE: melanoma antigen

MM : millimolaire

ng : nanogramme

NK : activité Natural Killer

nm : nanomètre

nt : nucléotide

Pb: paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

pg : picogramme

pH : potentiel hydrogène

RAGE : renal tumor antigen

RT-PCR : Reverse transcription-PCR

T : thymine

Taq : *Thermus aquaticus*

Tm : température de melting ou de fusion

U : unité

µg : microgramme

µl : microlitre

µM : micromolaire

1. Introduction

1.1 Antigènes spécifiques des tumeurs humaines

Aujourd'hui, l'existence d'antigènes spécifiques des cellules tumorales humaines est bien établie. Elle fut découverte dans le cadre d'études sur le mélanome humain. Trois avancées scientifiques furent nécessaires à la définition moléculaire d'un antigène reconnu en surface des cellules tumorales par des lymphocytes T cytolytiques (CTL).

1.1.1 Définition d'un antigène reconnu en surface des cellules tumorales

La première fut, suite à l'optimisation des conditions de culture et de clonage, l'obtention de clones stables de CTLs. Ainsi, pour un patient porteur d'un mélanome des clones CTLs furent obtenus : ils lysaient uniquement des cellules dérivées du mélanome autologue et non des cellules autologues normales ou des cellules sensibles à l'activité de lymphocytes T « Natural Killer » (NK) (Herin et al., 1987).

La deuxième fut la découverte de variants de perte d'antigène. Lorsque des cellules de la lignée dérivée du mélanome sont mises en présence de lymphocytes d'un clone CTL, une fraction d'entre elles survit. Les cellules survivantes peuvent être lysées par d'autres clones CTL, ce qui prouve l'existence de différents antigènes en surface des cellules tumorales (Van den Eynde et al., 1989).

Enfin furent obtenus des clones du premier gène codant pour un antigène tumoral humain (van der Bruggen et al., 1991). Une bibliothèque d'ADN génomique des cellules du mélanome fut construite dans un vecteur bactérien. Elle comprenait le gène codant pour un des antigènes définis sur le mélanome reconnu par un clone CTL. Les différents cosmides de la bibliothèque furent transfectés dans un variant de perte de cet antigène afin de voir quel cosmide lui rendait sa sensibilité au clone CTL. La région qui transférait toujours l'expression de l'antigène fut identifiée. Elle servit de sonde pour hybrider une bibliothèque d'ADN complémentaire (ADNc) réalisée à partir d'ARN des cellules du mélanome. Les clones d'ADNc furent séquencés et révélèrent la séquence d'un gène composé de trois exons. Ce gène fut baptisé *MAGE-A1* pour «melanoma antigen A1».

1.1.2 Expression de l'antigène au niveau moléculaire

Cet antigène MAGE-A1.HLA A1 codé par le gène *MAGE-A1* est reconnu par un CTL CD8⁺ (figure 1.1). De tels lymphocytes reconnaissent des peptides de 8 à 10 acides aminés (aa) présentés en surface des cellules par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Ces peptides proviennent de protéines cytoplasmiques dégradées par le complexe du protéasome. Ils passent dans le reticulum endoplasmique grâce à un transporteur TAP. Là ils sont associés à la chaîne lourde de la molécule HLA de classe I et à la β 2-microglobuline qui forment la molécule d'histocompatibilité. Le complexe est alors transporté en membrane et peut être reconnu par les lymphocytes.

Pour définir avec précision le peptide codé par *MAGE-A1*, les variants de perte pour cet antigène furent incubés avec différents peptides. Ceux-ci dérivèrent de la séquence qui lors de sa transfection rendait les variants de perte à nouveau sensibles à la lyse. Un peptide de 9 aa fut ainsi identifié.

1.1.3 Spécificité tumorale des antigènes

L'expression de *MAGE-A1* fut recherchée dans différents tissus adultes normaux par reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Les résultats montrèrent que le gène *MAGE-A1* n'est exprimé dans aucun tissu normal à l'exception du testicule (van der Bruggen et al., 1991 ; De Smet et al., 1994) (tableau 1.1). Un anticorps dirigé contre la protéine MAGE-A1 fut utilisé pour mener une analyse immunohistochimique qui démontra que seules les cellules de la lignée germinale expriment le gène *MAGE-A1* (Takahashi et al., 1995). Cependant, ces cellules ne comportent pas de molécule HLA de classe I et ne peuvent dès lors présenter le peptide MAGE-A1 à leur surface. Ainsi l'antigène codé par le gène *MAGE-A1* est considéré comme antigène tumoral strict.

1.1.4 Antigènes tumoraux partagés

L'expression du gène *MAGE-A1* a été détectée par RT-PCR dans 25% des échantillons venant de mélanomes primaires. Elle ne se limite pas à ce genre de tumeur, le gène *MAGE-A1* est également exprimé dans des tumeurs de types histologiques différents telles que des adénocarcinomes du poumon, des carcinomes de l'œsophage et de la sphère ORL (van der Bruggen et al., 1991) (tableau 1.2).

On constate donc que l'antigène codé par le gène *MAGE-A1* est spécifique des cellules tumorales et partagé par un certain nombre de tumeurs. L'existence de ce type d'antigène montre l'intérêt de mettre en place une stratégie d'immunothérapie dirigée contre les cellules tumorales.

1.2 La famille des gènes *MAGE*

La famille des gènes *MAGE* humains connus à ce jour comprend 34 membres qui sont répartis, pour la majorité, dans quatre sous-familles : *MAGE-A*, *B*, *C* et *D*. Les gènes de ces 4 sous-familles sont localisés sur le chromosome X (Lucas, 2000).

1.2.1 Antigènes tumoraux partagés

Les 25 gènes des sous-familles *MAGE-A*, *B* et *C* sont des gènes spécifiques des tumeurs. Leur profil d'expression s'établit dans les cellules tumorales et les cellules de la lignée germinale mâle mais dans aucun autre tissu adulte sain. On les retrouve exprimés dans des tumeurs de types histologiques variés (tableau 1.2).

Certains gènes appartenant aux sous-familles *MAGE-A* et *B* ne sont détectés dans aucun tissu normal ou cancéreux. On pense qu'il s'agit de pseudogènes, on ne trouve d'ailleurs pas de grille de lecture codant pour une protéine homologue aux protéines *MAGE* dans la séquence de ces gènes. Aussi, aucun transcrit n'a été mis en évidence à ce jour pour ces gènes.

1.2.2 Gènes *MAGE* ubiquistes

Les gènes appartenant à la sous-famille *MAGE-D* qui comporte 4 membres ainsi que les *MAGE-E1*, *F1*, *G1*, *H1*, *I1* présentent un autre profil d'expression (Lucas, 2000). On les retrouve dans tous les tissus adultes normaux, à l'exception de *MAGE-I1* qui semble avoir une expression restreinte à quelques tissus normaux, et peut donc être qualifié de gène ubiquiste.

1.2.3 Homologie de séquences entre les différentes protéines *MAGE*

Entre les protéines des différentes sous-familles de la famille *MAGE* existe un domaine conservé d'environ 200 aa (figure 1.2). Celui-ci doit, si les protéines *MAGE* partagent une fonction commune, assurer cette fonction. Les autres régions peuvent coder pour des fonctions spécifiques d'une ou plusieurs protéines *MAGE* (Lucas, 2000).

En amont et en aval de ce domaine conservé, les séquences protéiques *MAGE* varient d'une sous-famille à l'autre. Des homologies peuvent exister pour ces régions entre les différents membres d'une même sous-famille. Ainsi, les extrémités N-terminales des protéines *MAGE-A* présentent des homologies de séquence.

1.2.4 Evolution vers une famille à membres multiples

Une hypothèse a été émise afin d'expliquer l'apparition de membres multiples dans la famille des gènes *MAGE* (Lucas, 2000). Les gènes ubiquistes *MAGE-D* ont leur domaine conservé composé de 9 exons, chez les autres gènes *MAGE* il n'y en existe qu'un seul. On peut penser que les gènes *MAGE-D* dérivent d'un gène *MAGE* ancestral constitué de plusieurs exons. Les autres quant à eux proviendraient de rétrogènes issus de la rétroposition de molécules d'ARN messager matures de *MAGE-D*. On ne trouve cependant pas d'arguments supplémentaires à cette hypothèse.

1.3 La famille des gènes *MAGE-A* humains

1.3.1 Découverte des différents membres de la famille *MAGE-A*

La famille des gènes *MAGE-A* comporte douze membres. Le premier antigène spécifique des cellules tumorales défini au point de vue moléculaire permit d'établir le premier membre de cette famille, à savoir le gène *MAGE-A1*. A partir de ce gène d'autres furent découverts. Une sonde radioactive *MAGE-A1* fut utilisée pour un Southern Blot d'ADN génomique humain digéré par l'enzyme de restriction BamHI, elle reconnaissait treize fragments de restriction différents (De Plaen et al., 1994).

Une famille de gènes comportant des homologies de séquence semblait donc exister. Onze membres nommés *MAGE-A2* à *MAGE-A12* furent ensuite isolés par hybridation d'une bibliothèque de cosmides par une sonde *MAGE-A1* (De Smet et al., 1994; De Plaen et al., 1994). Tous ces gènes sont localisés sur le bras long du chromosome X en q28 (figure 1.3) (Rogner et al., 1995).

1.3.2 Expression des gènes *MAGE-A*

Une étude par RT-PCR utilisant des couples d'amorces spécifiques de chaque gène *MAGE-A* a permis de déterminer le profil d'expression des douze gènes de la famille (De Plaen et al., 1994). Ce profil est comparable pour tous, à l'exception de *MAGE-A7* qui n'est détecté dans aucun tissu adulte normal ou tumoral. *MAGE-A7* est donc probablement un pseudogène.

Les gènes *MAGE-A* sont exprimés dans des tumeurs de types histologiques variés. On ne les détecte dans aucun tissu adulte normal à l'exception du testicule et du placenta (De Plaen et al., 1994). Tous sont exprimés dans une proportion variable d'échantillons de tumeurs de types histologiques variés. Certains, comme les gènes *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A6*, *A10* et *A12*, sont exprimés dans ≈ 25 à 75% des mélanomes, des carcinomes du poumon, des carcinomes infiltrants de la vessie et des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage, de la tête et du cou (van der Bruggen et al., 1991). Les gènes *MAGE-A5*, *A8*, *A9* et *A11* ne sont

exprimés quant à eux que dans un nombre limité de tumeurs. Il existe également des types de tumeurs n'exprimant que rarement les gènes *MAGE-A*, comme par exemple le carcinome rénal. (tableau 1.2)

1.3.3 Structure des gènes *MAGE-A*

Les gènes *MAGE-A* présentent un exon terminal reprenant l'entièreté de la séquence codante (figure 1.4). Cet exon est en général précédé d'exons plus petit non-codants. Le gène *MAGE-A11* est l'unique exception, il comprend trois petits exons codants qui précèdent l'exon terminal contenant le reste de la phase de lecture (Irvine and Coetzee, 1999). Le gène *MAGE-A1* comporte 3 exons. La structure exon-intron des gènes *MAGE-A2*, *A3*, *A4*, *A6* et *A12* a été établie en alignant des séquences génomiques avec les clones d'ADNc qui présentaient une identité complète avec les segments de ces séquences. Il existe quelques variantes au niveau de la structure de ces gènes. Les premiers introns de *MAGE-A2*, *A3* et *A12* présentent de larges délétions par rapport à *MAGE-A1*. Chez *MAGE-A4* on trouve huit séquences qui servent de premiers exons alternatifs. *MAGE-A2* présente un exon supplémentaire homologue à une séquence localisée dans le premier intron de *MAGE-A1*.

Le pourcentage d'identité de la séquence codante des gènes *MAGE-A* varie de 60 à 98%. L'identité la plus élevée (98%) étant observée entre la séquence du gène *MAGE-A3* et celle du gène *MAGE-A6*.

Une comparaison des séquences de tous les gènes *MAGE-A* vis-à-vis de séquences connues des banques de données d'acides nucléiques n'a pas montré d'homologie significative.

1.3.4 Etude de la régulation transcriptionnelle

Afin de déterminer la régulation transcriptionnelle des gènes *MAGE-A*, une étude en détail des mécanismes régulant l'expression de *MAGE-A1* fut réalisée. Tout d'abord les facteurs de transcription nécessaires furent identifiés (De Smet et al., 1995). Ceux-ci apparurent fonctionnels dans des cellules n'exprimant pas *MAGE-A1*, l'expression ne devait donc pas être régulée par leur présence.

On découvrit l'existence d'un îlot CpG appartenant à la séquence promotrice du gène, sa méthylation semblait être la clé de la régulation transcriptionnelle de *MAGE-A1* (De Smet et al., 1996; De Smet et al., 1999). Lorsque cet îlot est méthylé le gène *MAGE-A1* n'est pas exprimé, alors qu'en cas de déméthylation il l'est. L'utilisation d'un agent déméthylant chez des cellules ne transcrivant pas *MAGE-A1* permet l'expression de celui-ci. Par ailleurs, la méthylation de l'îlot CpG du promoteur *MAGE-A1* inhibe la liaison des facteurs de transcription nécessaires (De Smet et al., 1996).

Dans la lignée germinale mâle une déméthylation globale du génome a lieu lors de la spermatogenèse, ainsi la transcription peut se produire. Dans les tumeurs ce phénomène est aussi observé, les tumeurs métastatiques sont généralement plus déméthylées que les tumeurs

primaires et effectivement l'expression de *MAGE-A1* y est plus fréquente (De Smet et al., 1996) (tableau 1.2).

Les autres gènes *MAGE-A* présentent également un îlot CpG dans la région du promoteur et sont donc probablement régulés par méthylation.

1.4 Autres gènes codant pour des antigènes de tumeurs spécifiques et partagés

Des antigènes différents de ceux issus des gènes *MAGE* reconnus par des clones de CTLs furent découverts. La séquence du gène codant, celle du peptide encodé ainsi que la molécule HLA le présentant en surface cellulaire furent identifiés.

L'utilisation d'une technique de clonage alternative permet d'obtenir plus facilement des clones d'antigènes reconnus par des CTLs (Coulie et al., 1994). Une lignée de cellules dérivées d'un rein de singe, CV1 Origin defective SV40-7 (COS-7), fut utilisée pour la transfection. Ces cellules expriment de façon stable l'antigène T du virus SV40, cet antigène est un activateur de l'origine de réplication du virus. Une bibliothèque d'ADNc est construite à partir de l'ARN de cellules reconnues par un CTL dans un vecteur d'expression eucaryote qui contient l'origine de réplication du virus SV40, ce vecteur peut donc être fortement amplifié par réplication dans les cellules COS-7.

On transfecte l'ADN de ces vecteurs dans les cellules COS-7 en même temps que l'ADN d'un vecteur d'expression comprenant le gène codant pour la molécule HLA présentatrice de l'antigène, ainsi celui-ci pourra être exprimé en surface cellulaire. Grâce à l'amplification par réplication des vecteurs, les cellules peuvent être testées 24 à 48h après la transfection. On teste la reconnaissance des transfectants par les CTLs afin de déterminer lequel porte la molécule d'ADNc qui transfère l'expression de l'antigène.

1.4.1 Les gènes *BAGE* et *GAGE*

Grâce à cette technique de clonage d'antigène, de nombreux gènes reconnus par des CTLs anti-tumoraux furent identifiés (Van den Eynde and van der Bruggen, 1997). Certains présentent un profil d'expression identique aux gènes *MAGE* et, comme ceux-ci, codent pour des antigènes de tumeurs spécifiques et partagés.

Le gène *BAGE1* (B melanoma antigen) code pour une protéine de 43 aa et il appartient à une famille de gènes homologues dont cinq membres ont été caractérisés (Boel et al., 1995 ; Ruault et al., 2002). Ces gènes n'ont pas d'homologie de séquence avec les gènes de la famille *MAGE*, mais comme la plupart d'entre eux ils ne sont exprimés dans aucun tissu adulte normal à l'exception du testicule. Ils sont également faiblement exprimés dans des tumeurs de types histologiques variés. Ils sont localisés sur les chromosomes 13 et 21 dans les régions juxtacentromériques. Le gène *BAGE1* est localisé sur le chromosome 21 en p11.2.

D'autres clonages d'antigènes mirent à jour la famille des gènes *GAGE* (G antigen) qui se compose d'au moins neuf membres homologues (Van den Eynde et al., 1995; De Backer et al., 1999). Les gènes *GAGE* sont portés par le chromosome X en p11.2-p11.4. Tout comme le gène *BAGE* ils ne présentent pas d'homologie de séquence avec les gènes *MAGE*. Ils présentent le même profil d'expression : restriction aux tumeurs et au testicule. L'activité transcriptionnelle semble également être régulée par l'état de méthylation du promoteur : un agent déméthylant entraîne l'expression de ces gènes.

1.4.2 Le gène *RAGE*

Le gène *RAGE* (renal tumor antigen) code pour un antigène reconnu par des CTLs et qui fut découvert en surface de cellules de carcinome rénal (Gaugler et al., 1996). Ce gène est activé dans des tumeurs de types histologiques variés et ne l'est pas dans la plupart des tissus normaux. Cependant il est exprimé par des cellules rétinienne humaines. Si ces cellules, comme beaucoup de cellules de la rétine, n'expriment pas les molécules HLA de classe I, l'antigène *RAGE* pourra être considéré comme spécifiquement tumoral. Le gène *RAGE* est localisé sur le chromosome 14 en q32.

1.5 Fonction des protéines *MAGE*

Les gènes *MAGE* codent pour des protéines de 300 à 370 aa dont à ce jour on ne connaît pas la fonction. Les zones hydrophobes et hydrophiles des protéines de la famille *MAGE* sont conservées, cela suggère qu'elles partagent une fonction identique. La duplication du gène *MAGE* en de nombreuses familles permettrait ainsi de mettre une même fonction sous le contrôle de différents promoteurs (Boon et al., 1995).

1.5.1 Gènes *MAGE* ubiquistes

Le profil d'expression des gènes *MAGE* ubiquistes ne semble pas fournir d'information importante sur la fonction protéique. Il pourrait s'agir de gènes de maintenance essentiels à la survie cellulaire. Mais il est également possible qu'il existe une régulation post-transcriptionnelle de la fonction des protéines codées.

1.5.2 Profil d'expression des gènes *MAGE* dans les tissus normaux

Le profil d'expression des gènes *MAGE-A*, *B* et *C* dans les tissus normaux pourrait être indicateur de la fonction protéique.

Ces gènes sont exprimés dans les cellules germinales mâles, mais ils ont également été détectés dans le placenta et le testicule fœtal (De Plaen et al., 1994) (tableau 1.1). Les

protéines codées par les gènes *MAGE-A*, *B* et *C* pourraient donc avoir un rôle dans certaines étapes du développement embryonnaire ou de la différenciation des cellules de la lignée germinale (Lucas, 2000).

L'existence de gènes *MAGE* murins exprimés au cours du développement embryonnaire, pareillement aux gènes *MAGE* humains, est intéressante car elle permettra d'investiguer dans cette voie (De Backer et al., 1995; De Plaen et al., 1999).

1.6 Immunothérapie dirigée

La découverte d'antigènes spécifiques et partagés des cellules tumorales a mis à jour la possibilité de développer une stratégie d'immunothérapie dirigée. Ces antigènes étant définis au niveau moléculaire, on peut envisager la création de vaccins utilisables par de nombreux patients cancéreux. Ces vaccinations auront pour but de stimuler les effecteurs immunitaires dirigés spécifiquement contre les cellules tumorales. L'existence de ceux-ci chez les patients cancéreux a en effet bien été démontrée, mais ils semblent en général incapables d'entraîner directement le rejet des tumeurs.

Ce type de procédé repose donc sur une participation *in vivo* du système immunitaire et s'accompagne d'une mémoire immunitaire permettant une réponse plus rapide et plus forte lors d'injections ultérieures.

Pour mettre en place une stratégie de vaccination il faut connaître non seulement la séquence des peptides antigéniques, mais aussi les molécules HLA qui les présentent en surface. Chaque vaccin pourra être administré à des patients dont les tumeurs expriment l'antigène tumoral présenté par la molécule HLA correspondante.

1.6.1 Protéines MAGE ubiquistes

L'existence de gènes *MAGE* exprimés dans les tissus adultes normaux souleva la question de la spécificité tumorale des antigènes codés par ceux exprimés uniquement dans les tumeurs et la lignée germinale mâle. Si des peptides reconnus par les CTLs dériveraient également de protéines codées par les gènes ubiquistes, leur utilisation en immunothérapie serait vaine, vu la tolérance immunitaire que le patient développerait certainement à leur égard. On a donc vérifié que la séquence d'aucun peptide antigénique *MAGE* connu ne se retrouvait dans la région correspondante des protéines *MAGE* ubiquistes (Lucas, 2000). Grâce à cette étude la spécificité tumorale des antigènes ne semble pas devoir être remise en cause.

1.6.2 Différentes stratégies d'immunothérapie anti-cancéreuse

Les vaccins injectés aux patients afin de déclencher le rejet de la tumeur par le système immunitaire peuvent être de plusieurs types (figure 1.5).

Une première possibilité est d'injecter des cellules irradiées exprimant l'antigène. Des gènes codant pour des interleukines peuvent être transfectés dans ces cellules afin de les rendre plus immunogènes (Boon et al., 1995).

Une autre approche consiste à obtenir du patient des cellules qui présentent bien les antigènes aux lymphocytes T, tels les macrophages ou des cellules dendritiques. Ces cellules sont incubées *in vitro* en présence du peptide antigénique voulu, celui-ci va alors se placer sur les molécules HLA de classe I. La protéine entière peut également servir à l'incubation, les cellules la capturent, la dégradent et la présentent en surface. Les cellules sont ensuite réinjectées au patient. Des essais cliniques utilisant cette méthode ont été réalisés sur des patients porteurs de mélanome. Ces traitements n'ont pas montrés d'effets secondaires importants et des régressions tumorales partielles furent observées (Turner et al., 1999).

L'infection des macrophages ou des cellules dendritiques par des virus recombinants porteurs de la séquence codant le peptide antigénique est une autre stratégie. Des rétrovirus ou des adénovirus peuvent être utilisés. On pense également à des injections directes de virus recombinants aux patients afin de les immuniser (Boon et al., 1995).

En exprimant le gène dans des bactéries ou des levures, il est possible de produire la protéine MAGE voulue en grande quantité. Cette protéine, associée à un adjuvant, peut servir à la vaccination. Le peptide antigénique peut lui-même être directement injecté au patient et déclencher une réponse immunitaire.

1.6.3 Stratégie de vaccination par injection de peptide antigénique

La création d'un peptide immunisant relève de la connaissance de la protéine dont il dérive et de la molécule HLA qui le présente en surface. Les membres de la famille *MAGE-A* sont de bons candidats à la recherche de peptides immunisants car ils sont exprimés dans un grand nombre de tumeurs de types histologiques variés (tableau 1.3).

Cette approche fit l'objet d'un essai clinique important (Marchand et al., 1999). Le but était d'immuniser des patients porteurs d'un mélanome métastatique avec un peptide MAGE-A3 présenté aux CTLs par la molécule HLA-A1. L'étude fut réalisée chez 25 patients.

Le traitement ne montra aucune forme de toxicité chez les différents patients. Chez 7 d'entre eux des régressions tumorales furent observées, trois d'entre elles furent complètes. Six des sept régressions eurent lieu chez des patients ne présentant pas de métastases viscérales, mais seulement des métastases cutanées. Il semblerait donc, bien que les résultats ne soient le reflet que d'un petit nombre de patients, que les formes les moins avancées de la maladie répondent mieux au traitement. Cela a été démontré pour d'autres types de thérapies, tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie.

La majorité des régressions tumorales mirent, après injection, quelques mois avant d'apparaître et mirent plusieurs mois à devenir complètes. Ce profil de régression semble indiquer qu'une faible réponse immunitaire anti-MAGE a seulement pu être déclenchée par le traitement. Les cellules cancéreuses disposent de mécanismes qui leur permettent peut-être d'échapper aux réponses immunitaires provoquées par les immunisations.

Des progrès sont nécessaires pour améliorer l'intensité de la réponse immunitaire. La possibilité d'immuniser simultanément contre plusieurs antigènes semble être un atout important, en effet, il sera plus difficile pour les cellules de se soustraire à une attaque multiple. Des études sont dès lors réalisées en ce sens (Lucas, 2000).

1.7 Détection des 12 gènes *MAGE-A*

La famille des gènes *MAGE-A* semble tout indiquée pour développer une stratégie d'immunothérapie, ses membres sont exprimés dans un grand nombre de tumeurs de types histologiques variés. Il fallait donc mettre au point des méthodes permettant d'analyser l'expression des différents membres de la famille dans les cellules tumorales. En effet, la connaissance du pattern d'expression de ces gènes est nécessaire pour identifier les patients éligibles pour une vaccination. Il est également important de savoir quelles sont les molécules HLA qui présentent les peptides en surface. Le typage des molécules HLA est réalisé à partir des cellules sanguines du patient.

1.7.1 Stratégie développée à Institut Ludwig de Recherche contre le Cancer (LICR)

Les ARN messager (ARNm) des gènes *MAGE-A* présentent des tailles fort proches, on ne pouvait donc pas les discriminer grâce à un northern blot. Une stratégie reposant sur la technique de RT-PCR fut donc mise au point (De Plaen et al., 1994). L'ARN total est extrait des cellules, il est ensuite rétrotranscrit et amplifié par PCR. Les amorces utilisées dans cette PCR furent choisies spécifiquement pour chacun des gènes (figure 1.4). Celles qui furent définies pour les gènes *MAGE-A1* à *MAGE-A11* se situent dans des exons différents, ce qui permet de détecter une contamination par de l'ADN génomique. En effet, les amplicons obtenus à partir de l'ADN génomique seront de taille supérieure à celle de ceux issus de l'ADNc et pourront être distingués par électrophorèse sur gel d'agarose. Récemment, une paire d'amorces se situant dans des exons différents a également été sélectionnée pour le gène *MAGE-A12*.

Ces amorces permettent une amplification de fragments de tailles différentes pour chacun des gènes. Leur discrimination s'effectue par électrophorèse. Cette approche est semi-quantitative. En effet, le niveau d'expression des gènes *MAGE-A* d'un échantillon donné peut être évalué par comparaison de l'intensité des bandes obtenues sur gel d'agarose après électrophorèse, avec celles obtenues pour les amplicons d'ADNc issu de lignées cellulaires tumorales de référence (De Plaen et al., 1994).

L'évaluation de l'expression des gènes *MAGE-A* mit en évidence une grande variabilité de leur niveau d'expression. Comme la technique de discrimination utilisée repose sur le taux d'ARNm présent et l'immunothérapie sur les antigènes présents en surface, il faut s'interroger sur le rapport entre le taux d'ARNm présent pour un gène et la quantité de protéine engendrée. A l'heure actuelle, il existe peu d'anticorps réellement spécifiques des antigènes *MAGE-A*. Cependant, une étude utilisant un anticorps monoclonal reconnaissant *MAGE-A4* montra une corrélation entre le niveau d'expression déterminé par RT-PCR pour des tissus tumoraux et le marquage par l'anticorps de ces tissus (Landry et al., 2000).

Une autre étude permit de déterminer le niveau d'expression du gène *MAGE-A1* requis pour engendrer la lyse cellulaire par les CTLs (Lethe et al., 1997). Il faut un niveau d'expression supérieur à 10% de celui de la lignée cellulaire de référence MZ2-MEL, c'est-à-dire plus de trois molécules d'ARNm par cellule. La technique de RT-PCR permet de détecter les gènes *MAGE-A* exprimés à un niveau plus faible et s'avère donc assez efficace.

Cette méthode est robuste mais demande beaucoup de travail pour sa réalisation. En effet, des PCR séparées comportant des amorces spécifiques de chaque gène, des températures d'annealing et des nombres de cycles différents doivent être réalisées pour détecter la présence des ARNm correspondant aux divers gènes *MAGE-A*. L'utilisation des microdamiers à ADN offre une alternative à cette stratégie.

1.7.2 Stratégie de discrimination sur microdamier à ADN

1.7.2.1 Les microdamiers à ADN dans l'analyse diagnostique

Les microdamiers apparaissent aujourd'hui comme un outil important dans l'analyse de séquences d'acides nucléiques. Ce sont des supports solides sur lesquels sont fixées des sondes d'ADN qui vont permettre une identification simultanée de plusieurs séquences cibles. Les cibles d'ADN ou d'ARN sont extraites à partir de sources biologiques, l'incorporation de nucléotides porteurs de molécules marqueurs permettra leur détection. Les cibles sont ensuite hybridées sur le damier, les réactions d'hybridation vont conduire à la formation d'hétéroduplexes entre les séquences cibles marquées et les séquences sondes qui leur sont complémentaires. Les signaux correspondants aux molécules hybridées sont détectés et comme chaque sonde a une localisation précise sur le damier, il est alors possible d'identifier la cible s'y étant hybridée.

Il existe deux types d'applications utilisant les microdamiers à ADN. La première est l'expression de gènes qui permet une analyse semi-quantitative de l'ARNm. Celui-ci est rétrotranscrit et marqué puis hybridé sur le damier, l'intensité des signaux obtenus apporte une information sur le niveau d'expression. Avec ce type d'approche on peut comparer le profil d'expression d'un gène dans différentes situations, par exemple, dans un tissu sain et dans un tissu malade. La seconde est celle utilisée dans la problématique des gènes *MAGE*, il s'agit d'une analyse qualitative pouvant servir dans un but diagnostique. L'ADN génomique ou l'ARNm rétrotranscrit est d'abord amplifié par PCR avant d'être hybridé. Etant donné que les amplifications de différentes séquences d'ADN ne se réalisent pas avec la même efficacité, les signaux obtenus après PCR ne peuvent donc être corrélés à la quantité d'ADN présente avant PCR (Zammatteo et al., 2002a). Sur base d'un alignement des séquences cibles

d'intérêt, les zones les plus conservées peuvent servir à définir une paire d'amorces consensus pour leur amplification simultanée. Grâce à cette stratégie, tous les gènes d'intérêt peuvent être amplifiés en une seule fois, ce qui diminue considérablement le temps d'exécution et le coût du test.

Au sein de la séquence délimitée par les amorces, les zones de moindre conservation permettent de sélectionner les sondes spécifiques de chaque gène amplifié. Ces sondes, une fois immobilisées sur un support solide, servent à la capture et à la discrimination des produits de l'amplification PCR.

Les lames de verre sont aujourd'hui le support standard pour la fabrication des microdamiers. Les damiers peuvent être réalisés par dépôt d'une petite quantité de chaque sonde à un point précis du support solide que l'on appellera spot. Cette méthode n'impose pas de restriction de taille des sondes utilisées contrairement à celles permettant la synthèse *in situ* des sondes. Celles-ci doivent être fixées de façon covalente à leur support. Pour cela la surface des lames de verre peut être modifiée par l'introduction de fonctions spécifiques permettant la formation de liens covalents avec les sondes d'ADN. La méthode la plus utilisée est la liaison de l'extrémité amino-terminale des oligonucléotides à une fonction aldéhyde présente sur le support (Zammatteo et al., 2002a). La fixation d'une sonde par son extrémité permet un bon contrôle de la longueur et de la séquence disponible pour l'hybridation.

Différents paramètres influencent le taux d'hybridation entre les sondes et les molécules d'ADN cibles, tels que la concentration en sonde capteur et en cible, la composition de leurs séquences respectives, la force ionique du milieu et la température. Il est important, lors de la fabrication des microdamiers, que les sondes capteurs soit en large excès par rapport aux ADN cibles, ainsi une réaction cinétique de pseudo-premier ordre est mise en place et le taux d'hybridation dépend majoritairement de la concentration en cible. Ainsi, au cours de la fabrication des microdamiers, de petites différences dans la quantité de sonde déposée n'aura pas de répercussion sur le taux d'hybridation. La présence de cations monovalents peut augmenter le taux d'hétéroduplexes formés en neutralisant les charges négatives des groupements phosphates des molécules d'ADN. Les molécules d'ADN chargées négativement auront en effet tendance à se repousser l'une l'autre. La température aura un effet positif sur le taux d'hybridation à condition qu'elle soit suffisamment en dessous de la température de melting (T_m) des hétéroduplexes. Pour chaque application des microdamiers, des conditions optimales de températures et de salinité doivent être déterminées afin d'éviter les hybridations croisées de cibles sur des séquences sondes non complémentaires. Ces conditions sont d'autant plus difficiles à mettre en œuvre que les séquences à identifier ont un pourcentage d'identité élevé (Zammatteo et al., 2002a).

La détection des molécules hybridées peut être réalisée en fluorescence, de façon directe, par l'incorporation de nucléotides couplés à un fluorochrome, ou indirecte, en utilisant des nucléotides biotinylés qui permettront la fixation de streptavidine liée à un fluorochrome. La détection peut également être faite en colorimétrie, par exemple, par un processus autocatalytique de précipitation de sels d'argent.

Une application des microdamiers dans le cadre diagnostique est l'identification d'agents pathogènes de maladies infectieuses, tels les staphylocoques (Zammatteo et al., 2002a).

1.7.2.2 Utilisation des microdamiers pour détecter les gènes de la famille *MAGE-A*

La technique des microdamiers apparaît comme une alternative intéressante à la stratégie développée à l'Institut Ludwig pour la discrimination des douze membres de la famille *MAGE-A* car ils permettent une détection multiparamétrique. Une seule PCR peut être réalisée à l'aide d'amorces consensus pour amplifier globalement tous les gènes, ceux-ci sont distingués lors de l'hybridation (figure 1.6). Cette discrimination reste néanmoins difficile car les séquences entre les différents gènes *MAGE-A* sont fortement homologues et elles peuvent entrer en compétition pour une même sonde traqueur.

On utilise une détection colorimétrique basée sur la précipitation de sels d'argent pour révéler les hétéroduplexes formés sur le microdamier (Alexandre et al., 2001). Le marquage des séquences est réalisé par l'incorporation de nucléotides biotinylés lors de la PCR. Suite à l'hybridation, on ajoute des anticorps anti-biotine couplés à de l'or colloïdal qui viennent se fixer aux molécules de biotine. Lorsque l'or colloïdal est mis en présence d'une solution de sels d'argent (Ag^+) et d'une solution réductrice, il catalyse la réduction des ions Ag^+ en argent métallique (Ag^0). Ces précipités sont détectés et ils reflètent le pattern d'expression des gènes d'intérêt dans les cellules observées.

Le microdamier qui a été mis au point pour la détection des gènes *MAGE-A* comporte des sondes capteurs spécifiques de chacun des douze gènes (Zammatteo et al., 2002b). Il s'agit d'un damier de faible densité, c'est-à-dire ayant moins de 500 spots par cm^2 , ce qui permet une analyse simplifiée des résultats. Chacune de ces sondes est présente en triple spots. Ces sondes ont été choisies pour avoir la même longueur, 27 paires de bases (pb), ce qui offre la même facilité d'accès pour tous les amplicons. Elles devaient également avoir le plus grand nombre de mésappariements possibles entre leur séquence et celles des autres *MAGE-A* afin de diminuer le risque d'hybridation croisée. Le damier comprend également différents contrôles. De l'ADN biotinylé est directement fixé sur les lames et sert de contrôle pour l'étape de détection colorimétrique. Des sondes dont les séquences ne correspondent pas aux gènes *MAGE-A* sont utilisées comme contrôles d'hybridation. Le contrôle positif, qui doit toujours être détecté car sa séquence complémentaire biotinylée est ajoutée au mélange d'hybridation. Le contrôle négatif pour lequel la séquence complémentaire biotinylée n'est pas ajoutée au mélange, ne doit donc jamais être détecté. Ces deux contrôles servent à vérifier le bon fonctionnement de l'étape d'hybridation et sa spécificité (Zammatteo et al., 2002b). Le damier comporte un autre contrôle négatif, il s'agit de la sonde *MAGE-A7*. Le gène *MAGE-A7* est un pseudogène, il n'est donc jamais exprimé. Si un signal est détecté sur cette sonde, il reflète une contamination de l'ARNm par de l'ADN génomique (ADNg) (Zammatteo et al., 2002b).

1.7.2.3 Essai d'une première stratégie

La première stratégie mise en place dans l'utilisation des microdamiers reposait sur l'amplification des différents gènes *MAGE-A* grâce à une paire d'amorces consensus. La séquence de ces amorces dérive de séquences conservées situées dans le dernier exon des gènes *MAGE-A* (figure 1.7). Il n'a pas été possible de sélectionner les amorces dans des exons différents du fait d'une homologie de séquences insuffisante entre les 12 gènes *MAGE-A* au niveau des exons non codants. De ce fait, il n'est pas possible de distinguer sur base de

la taille les produits issus d'une amplification à partir d'ADNc de ceux issus d'ADNg. Cependant, comme *MAGE-A7* est un pseudogène, aucun signal ne devrait être observé sur la sonde capteur correspondante à moins d'avoir une amplification d'ADNg.

Des tests de limite de détection furent réalisés sur la lignée tumorale MZ2-MEL, exprimant les gènes *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, (*A5*), *A6*, *A10* et *A12* (Zammatteo et al., 2002b). A partir de 2 µg d'ARN total extrait, tous les gènes étaient détectés sur microdamier à l'exception de *MAGE-A12* qui est cependant bien exprimé dans cette lignée de référence. Pour une quantité d'ARN total plus faible que 2 µg, plusieurs gènes n'étaient pas détectés. Il fut mis en évidence que les ADNc des gènes *MAGE-A* n'étaient pas amplifiés avec la même efficacité lors de la PCR avec les amorces consensus. Pour les gènes souvent exprimés dans les cellules cancéreuses et dont la séquence présentait trois mésappariements avec la séquence de l'amorce consensus sens, on ajouta des amorces sens spécifiques aux réactifs de la PCR (figure 1.7). Ainsi l'efficacité de la PCR fut optimisée pour l'ADNc des gènes *MAGE-A1*, *A8* et *A12*. Ces amorces sont situées à la même position que l'amorce consensus sens.

Une validation de ce test fut réalisée sur 32 échantillons de différentes lignées de cellules tumorales, des tissus tumoraux et des tissus sains (Zammatteo et al., 2002b). Chaque échantillon fut testé quatre fois afin de vérifier la reproductibilité des résultats. Cette étude fut menée en parallèle de la méthode de discrimination par électrophorèse de produits de RT-PCR utilisée à l'Institut Ludwig (De Plaen et al., 1994). A l'avenir lorsque nous référeront à cette méthode nous parlerons de la méthode de référence.

Les deux méthodes semblaient donner des résultats identiques excepté pour les gènes *MAGE-A3* et *MAGE-A5*. Le gène *MAGE-A3* donnait un signal lors de certaines hybridations alors qu'il n'était pas détecté par la méthode de référence. Un séquençage des amplicons révéla la présence de *MAGE-A6* mais pas de *MAGE-A3*. Ces résultats indiquèrent que les faux positifs obtenus sur microdamier provenaient de l'hybridation croisée de *MAGE-A6* sur la sonde *MAGE-A3*. Une homologie de 96% entre les deux séquences est à l'origine de ce problème. On n'observe pas d'hybridation croisée des amplicons *MAGE-A3* sur la sonde de *MAGE-A6* car ces séquences ne partagent que 88% d'identité (tableau 1.4). Certains échantillons présentaient quant à eux un signal indiquant l'expression de *MAGE-A5* par la méthode d'hybridation et non par la méthode de référence. La sonde utilisée pour *MAGE-A5* ne présente que 85% d'homologie avec les autres séquences *MAGE*, il était donc peu probable qu'il s'agisse d'une hybridation croisée. Le test par microdamier semblait donc plus sensible que celui de référence pour la détection de l'expression de *MAGE-A5*. En accord avec cette explication, l'augmentation du nombre de cycles de PCR permit la détection de *MAGE-A5* dans ces échantillons par la méthode de référence. Les deux tests présentaient également quelques différences pour l'un ou l'autre gène exprimé à un niveau proche de la limite de détection de ces deux méthodes.

Dans cette étude, aucun signal n'a été observé sur la sonde capture *MAGE-A7* quels que soient les échantillons testés. Ceci indique que la contamination de ces échantillons par de l'ADNg était faible. Afin de confirmer cette observation, des RT-PCR n'ayant pas inclus de transcriptase inverse ont été réalisées pour les 32 échantillons d'ARN testés et les amplicons ont été hybridés sur microdamier. Aucun signal n'a été observé sur aucune des sondes du damier.

La première stratégie mise en place pour la discrimination des gènes *MAGE* sur microdamier comporte deux limitations. La première est le problème des signaux de faux

positifs obtenus pour *MAGE-A3* provenant de l'hybridation croisée d'amplicons *MAGE-A6*. La seconde est le manque de contrôle des étapes précédant l'hybridation telles l'extraction d'ARN total, la rétrotranscription et la PCR. Il fallait donc apporter des modifications à la stratégie de base afin de répondre à ces limitations.

Objectifs du mémoire

Afin de répondre aux limitations de la première stratégie utilisée pour discriminer les douze gènes *MAGE-A* sur microdamier à ADN, une méthode de PCR triplex sera mise en place (figure 1.8). Pour éviter l'obtention de signaux de faux positifs sur la sonde capteur du gène *MAGE-A3* suite à l'hybridation croisée d'amplicons du gène *MAGE-A6*, un couple d'amorces spécifiques au gène *MAGE-A3* sera ajouté. La discrimination entre les gènes *MAGE-A3* et *MAGE-A6* se fera sur base de la PCR. La sonde capteur fixée sur le damier sera complémentaire et spécifique d'une partie de la séquence amplifiée de *MAGE-A3* et devra donner lieu à l'apparition d'un signal uniquement lorsque *MAGE-A3* est amplifié.

Pour permettre le contrôle des étapes précédant l'hybridation, telles l'extraction d'ARN total, la rétrotranscription et la PCR, un gène ubiquiste sera utilisé comme contrôle endogène. Pour ce faire, un couple d'amorces spécifiques du gène ubiquiste, *MAGE-D2*, sera ajouté à la PCR. Ce gène ubiquiste a été choisi car son niveau d'expression est comparable à celui des gènes *MAGE-A*, ainsi son amplification ne s'effectuera pas de façon préférentielle à la leur. Une amplification doit toujours être observée pour ce gène sauf si un problème s'est produit durant les étapes précédant l'hybridation : dégradation de l'ARN extrait, inhibition des étapes de rétrotranscription et/ou de PCR.

Un nouveau damier sera constitué, la sonde *MAGE-A3* sera remplacée par celle complémentaire de la séquence amplifiée par les amorces spécifiques et une sonde complémentaire des amplicons *MAGE-D2* sera ajoutée (figure 1.9).

L'objectif de ce mémoire est l'optimisation de la stratégie de PCR triplex et la mise au point de l'hybridation. Les différents aspects du test (PCR, hybridation et détection colorimétrique) seront abordés : la spécificité, capacité d'identifier ce qui est réellement négatif, la sensibilité, capacité d'identifier ce qui est réellement positif (tableau 1.5) et la reproductibilité.

L'optimisation des conditions d'hybridation sera réalisée au départ d'amplicons correspondant différents *MAGE-A* et *MAGE-D2*. Les différents paramètres de l'hybridation et de la détection colorimétrique devront être testés afin d'obtenir une spécificité élevée, c'est-à-dire observer un signal unique pour chacun des gènes *MAGE-A*. La sensibilité du test devra être comparable à la méthode de référence. Cet objectif pourra être atteint en optimisant divers paramètres de la PCR. Suite à ces mises au point, la reproductibilité du test pourra être évaluée.

Après optimisation des conditions de PCR et d'hybridation, la limite de détection du test pourra être déterminée. De l'ADNc obtenu au départ de différentes quantités d'ARN total extrait de cellules de la lignée MZ2-MEL, sera amplifié et hybridé dans les conditions optimales. La limite de détection du test correspondra à la quantité minimale d'ARN total extrait permettant la détection de tous les gènes *MAGE-A* exprimés dans cette lignée cellulaire.

La validation du test sera la dernière étape de ce mémoire. Des échantillons qui expriment différents gènes *MAGE-A* et qui ont été caractérisés par la méthode de référence développée à l'Institut Ludwig de Bruxelles seront testés en réplicats par la méthode mise au point dans ce mémoire.

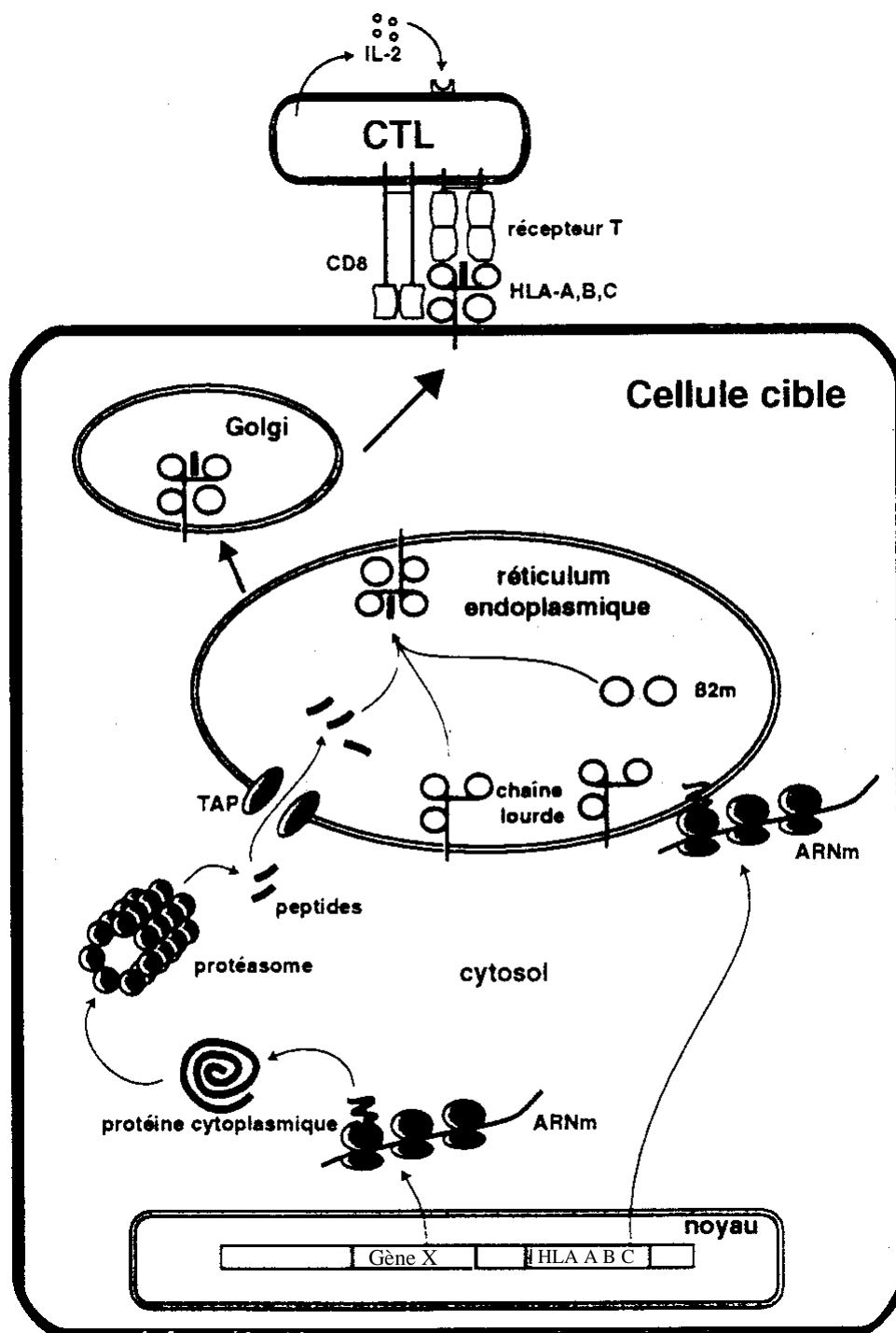
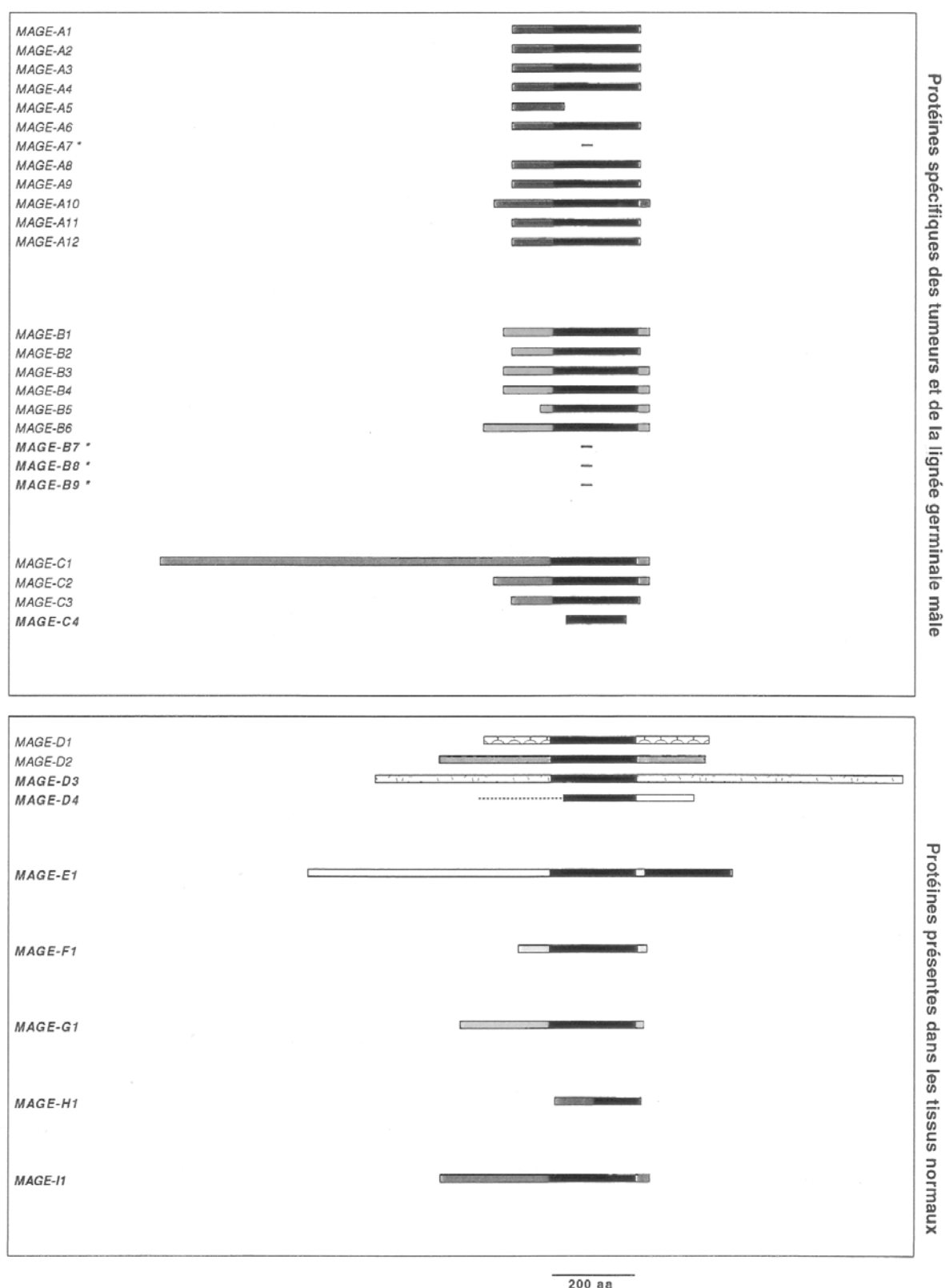


Figure 1.1

Présentation d'un antigène en surface cellulaire par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et reconnaissance par un lymphocyte T cytolytique
(D'après Boon et Cerottini 2000).

**Figure 1.2**Protéines codées par les gènes *MAGE* humains

Les astérisques désignent les pseudogènes probables. Les protéines sont représentées schématiquement par des boîtes. La région en noir représente le domaine MAGE conservé dans toutes les protéines (d'après Lucas, 2000).

Chromosome X

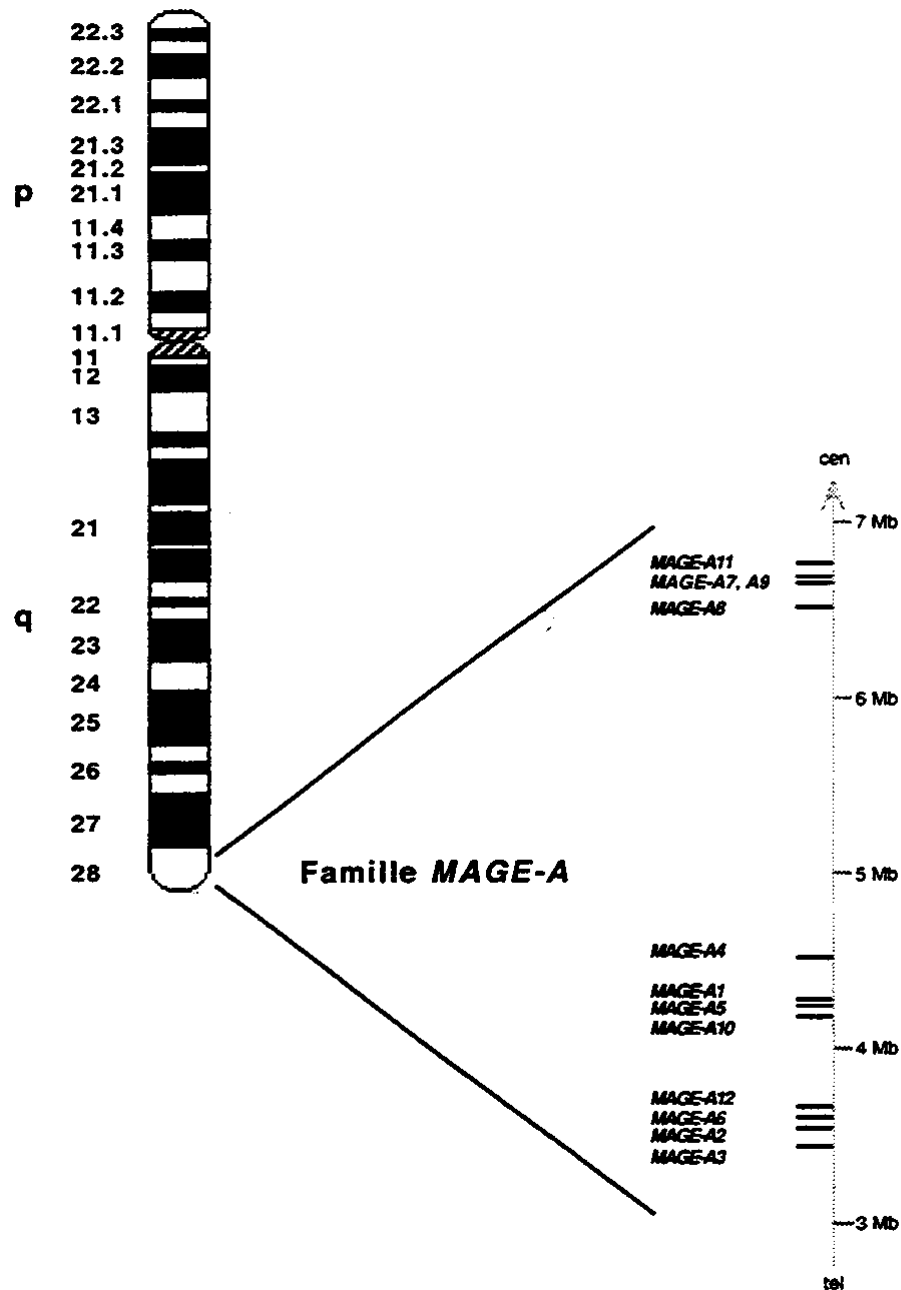


Figure 1.3

Localisation chromosomique des gènes *MAGE-A* (Rogner et al., 1995).

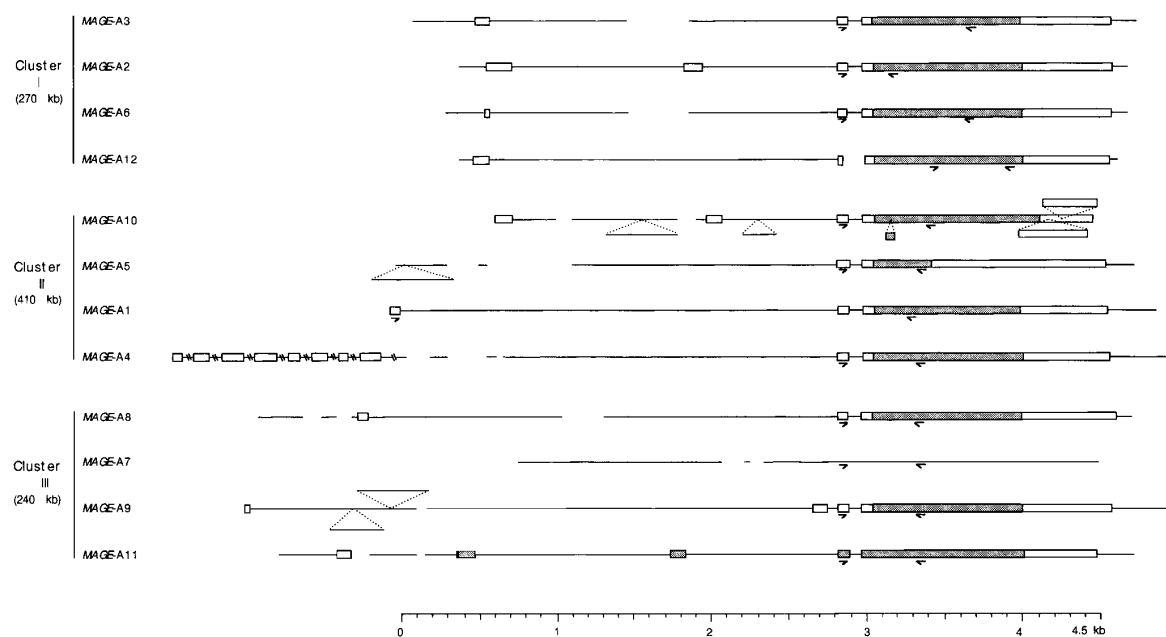


Figure 1.4
Structure des douze gènes *MAGE-A*

Les lignes montrent les parties de gènes qui ont été séquencées.

Les lignes pointillées correspondent aux délétions, les lignes en dessous des lignes principales correspondent aux insertions.

Les exons sont représentés par des boîtes, la région grise correspond à la séquence codante de chaque gène.

Les flèches indiquent l'emplacement des amorces utilisées pour l'amplification spécifique de chacun des gènes (Serrano et al., 1999).

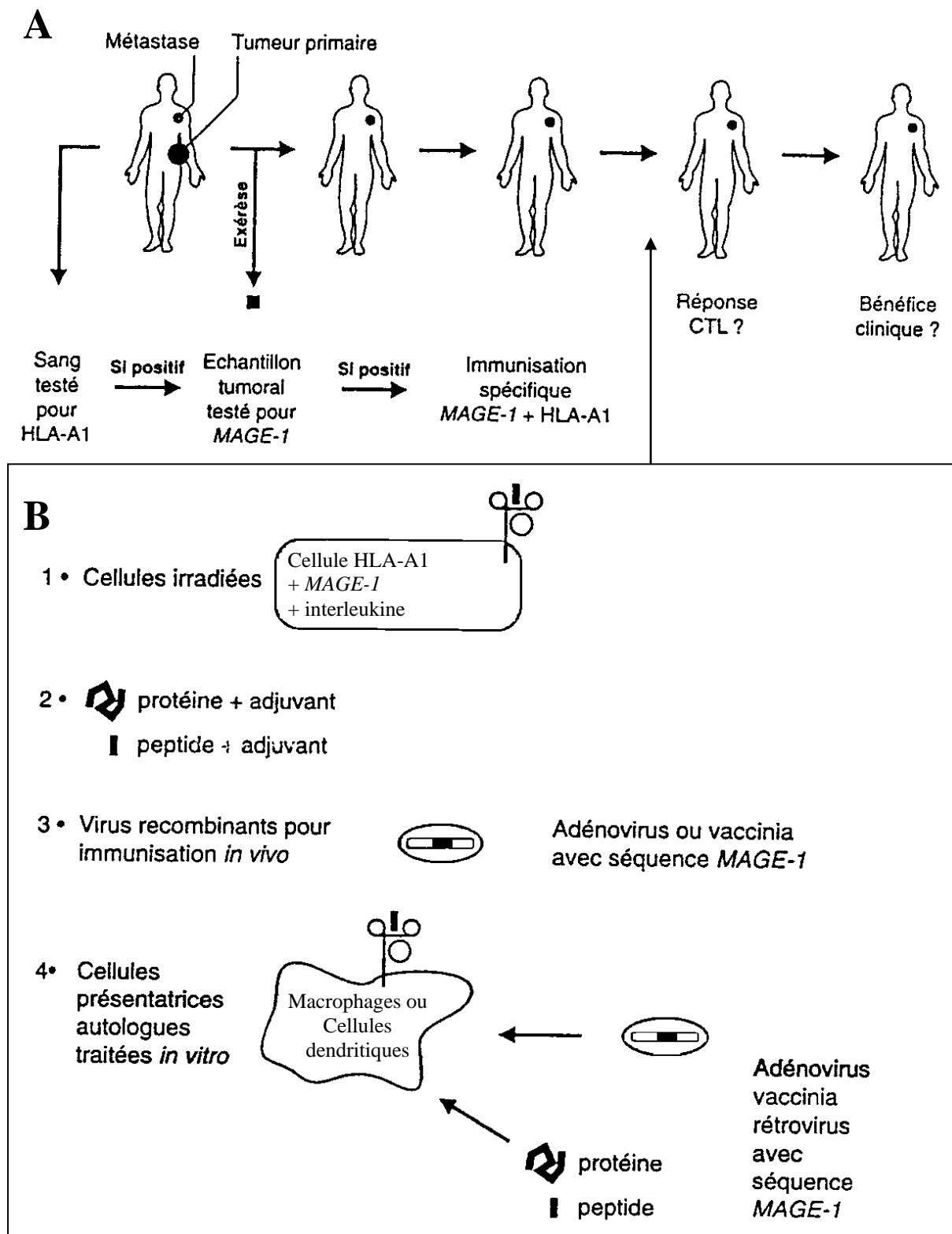


Figure 1.5

Immunisation : schéma général

A Typage de la molécule HLA du malade, test de l'expression du gène *MAGE* et essai d'immunisation pour l'antigène donné.

B Différentes voies d'immunisation envisageables (Boon et al., 1995).

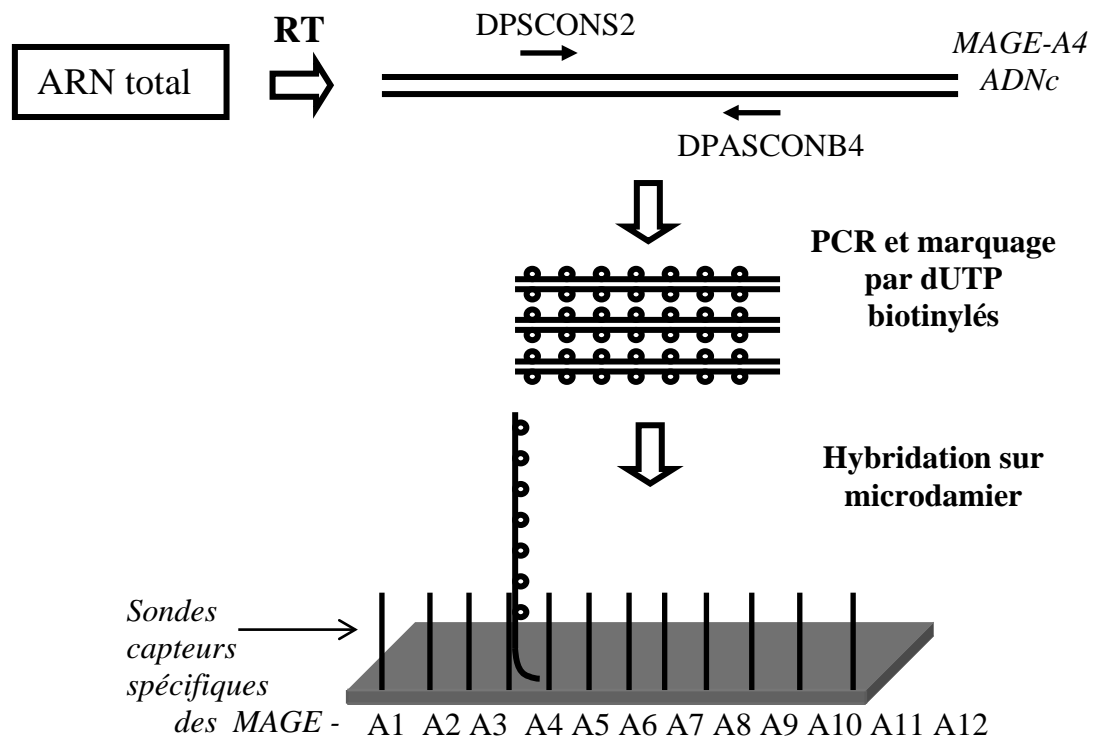


Figure 1.6

Utilisation des microdamiers pour détecter l'expression des différents gènes *MAGE-A*

Exemple pour le gène *MAGE-A4*.

L'ADNc obtenu par rétrotranscription d'ARN total extrait est amplifié par PCR avec les amorces consensus DPSCONS2 et DPASCONB4 en présence de dUTP biotinylés.

Les amplicons marqués sont hybridés sur le microdamier à ADN constitué de 12 sondes spécifiques des gènes *MAGE-A*.

Les hybrides sonde-amplicon seront détectés en colorimétrie par précipitation de sels d'argent (Zammatteo et al., 2002b).

Position			Position		
DPSCONS2		GGgctCcaGCagccaagAagAGGA	DPASCONB4		GCAGGaaaAcTACCTGgagTACCG
MAGE-1	234	GGGTTCCAGCAGCCGTGAAGAGGA	732		GCAGGAAAAGTACCTGGAGTACCG
MAGE-2	255	GGGCTCCAGCAACCAAGAAGAGGA	753		GCAGGAAAACCTACCTGGAGTACCG
MAGE-3	255	GGACTCCAGCAACCAAGAAGAGGA	753		GCAGGAAAACCTACCTGGAGTACCG
MAGE-4	258	GGGTTCCAGCAGCCAGAAGAGGA	756		GCAGGAAAACCTACCTGGAGTACCG
MAGE-5	255	GGGCTCCAGCAACCAAGAAGAGGA	754		GCAGGAAAACCTACCTGGAGTACCG
MAGE-6	255	GGACTCCAGCAACCAAGAAGAGGA	753		GCAGGAAAACCTACCTGGAGTACCG
MAGE-7	253	GGGCAACAGCAGCCGGGAAGAGGA	744		GCAGGAAAACCTACCTGCAATACCG
MAGE-8	255	GGGTTCCAGCAGCAATGAAGAGGA	763		GCAGGACAACTACCTGGAGTACCG
MAGE-9	243	GGGCTCCAGCAGTCAAGAAGAGGA	750		GCAGGAAAACCTACCTGGAGTACCG
MAGE-10	321	GGGCTCCAGCAGCCAAAAGGAGGA	838		GCAGGAAAACCTACCTGGAGTACCG
MAGE-11	255	GGGCTCTGGCAGCCAAGAAAGGA	762		GCAGGAAAAGTACCTGGTGTACCG
MAGE-12	255	GGGCTCCAGCAACCAAGAAGAGGA	753		GCAGGAAAACCTACCTGGAGTACCG

Figure 1.7

Alignement des séquences des amorces consensus avec les séquences correspondantes des douze gènes MAGE-A

Les régions identiques sont représentées en noir, les mésappariements sont représentés en blanc.

DPSCONS2 : amorce consensus sens

DPASCONB4 : amorce consensus antisens

(Zammatteo et al., 2002b).

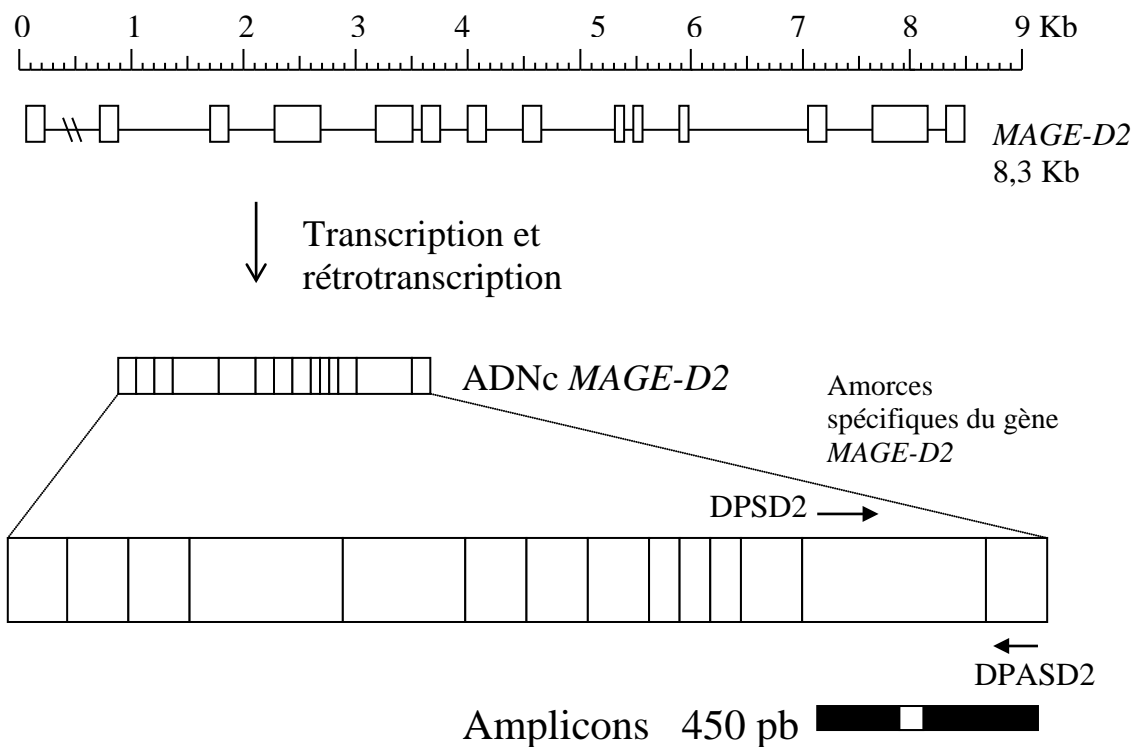
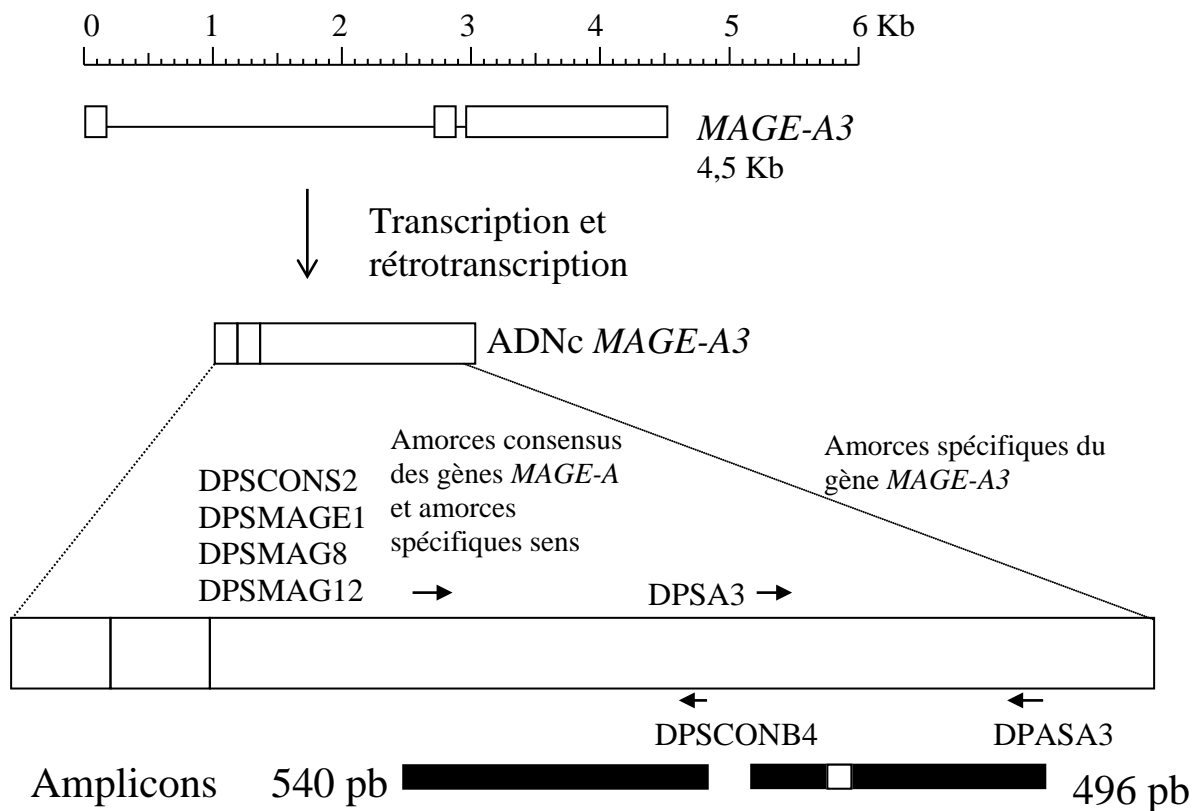


Figure 1.8

Amorces spécifiques utilisées dans la stratégie PCR triplex

Les amplicons obtenus sont représentés en noir.

La position de la sonde capteur est indiqué par la zone blanche sur les amplicons de *MAGE-A3* et *MAGE-D2*

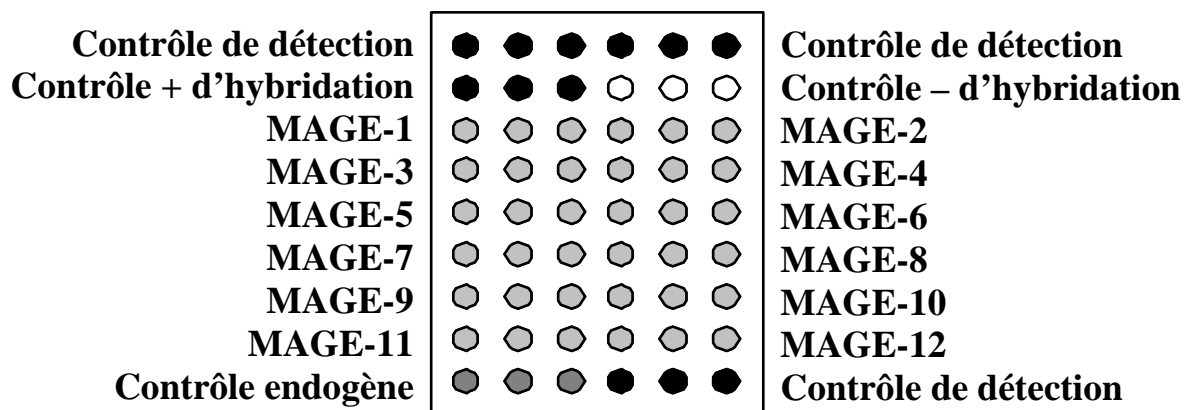


Figure 1.9

Design du microdamier *MAGE-A*

Chaque sonde capteur est présente en triplicats.

Le contrôle de détection et le contrôle positif d'hybridation sont représentés en noir. Pour chaque hybridation ces contrôles doivent donner un signal.

Le contrôle négatif d'hybridation apparaît en blanc. Pour chaque hybridation ce contrôle ne doit pas donner de signal.

Le contrôle endogène, séquence du gène ubiquiste *MAGE-D2*, est représenté en gris foncé.

Les sondes correspondant aux différents gènes *MAGE-A* sont représentées en gris clair.

Tableau 1.1

Expression de *MAGE-A1, A2, A3, A4, A6* et *A12* dans les tissus tumoraux et normaux.

	<i>MAGE 1</i>	<i>MAGE 2</i>	<i>MAGE 3</i>	<i>MAGE 4</i>	<i>MAGE 6</i>	<i>MAGE 12</i>
COLON CARCINOMAS						
MZ-CO-2 ¶	++	++	-	-	-	+
SK-CO-11 ¶	-	++	+++	-	+	++
LB150**	-	-	-	+	-	-
HSR 320 ¶	-	+++	+++	+	++	+++
LEUKEMIAS						
K562 ¶	-	++	+++	-	++	+++
MELANOMAS						
MI10221 ¶	+	+++	+++	+++	+++	+++
MZ2-MEL 3.0 ¶	+++	+++	+++	-	+++	+
LB265**	-	++	-	-	-	+
LG7**	-	++	-	-	-	-
LG11**	++	++	++	-	-	+++
LB271**	-	++	+++	-	++	+++
LUNG CANCERS						
LB178 (NSCLC)**	++	-	-	+++	-	-
LB175 (NSCLC)**	++	++	+++	+++	++	+++
LB11 (SCLC) ¶	++	+++	+++	-	-	+++
LB12 (SCLC) ¶	-	+++	+++	-	-	+++
SARCOMAS						
LB23 ¶	-	-	-	++	-	-
LB408**	-	-	-	++	-	-
LB258**	+	++	+	-	-	++
BREAST CARCINOMAS						
LB280**	++	-	++	-	-	+
LB284**	++	++	++	+	-	++
Stomach	-	-	-	-	-	-
Lung	-	-	-	-	-	-
Breast	-	-	-	-	-	-
Colon	-	-	-	-	-	-
Skin	-	-	-	-	-	-
Uterus	-	-	-	-	-	-
Testis	++	++	++	++	++	++
Thymocytes	-	-	-	-	-	-
EBV-lymphocytes	-	-	-	-	-	-
Foetal liver	-	-	-	-	-	-
Foetal brain	-	-	-	-	-	-
Placenta LB694	-	-	+	+++	-	-

Une RT-PCR est réalisée sur l'ARN de lignées cellulaires tumorales (¶), d'échantillons tumoraux(**) et de tissus normaux pour déterminer l'expression des gènes *MAGE*.

Le niveau d'expression est évalué par l'intensité des bandes des produits PCR sur gel d'agarose et est représenté ici par +++, ++, +. L'absence d'expression est indiquée par -.

(De Plaen, Arden et al. 1994)

Tableau 1.2
Pourcentage d'échantillons de tumeurs qui expriment les gènes *MAGE-A*¹

Type histologique	n ²	<i>MAGE-A1</i>	<i>MAGE-A2</i>	<i>MAGE-A3</i>	<i>MAGE-A4</i>	<i>MAGE-A6</i>	<i>MAGE-A10</i> ³	<i>MAGE-A12</i>
Mélanome								
-lésions primaires	83	25	52	55	18	59	21 (19)	34
-métastases	243	46	70	74	28	72	47 (236)	62
Carcinome pulmonaire								
-carcinome épidermoïde	93	44	42	48	59	53	50 (20)	28
-adénocarcinome	43	49	47	44	35	49	40 (15)	33
Carcinome de la tête et du cou	85	31	38	51	53	58	35 (20)	27
Carcinome de la vessie								
-superficiel (< T2)	70	14	11	16	23	19	33 (15)	10
-infiltrant (≥ T2)	53	32	43	57	45	57	33 (15)	34
Carcinome oesophagien								
-carcinome épidermoïde	19	53	53	63	74	68	40 (15)	26
-adénocarcinome	5	20	40	20	20	20		40
Carcinome de la prostate	22	18	18	18	0	23	10 (10)	5
Sarcome	13	8	15	8	15	15	7 (15)	8
Carcinome mammaire	135	19	9	13	6	15	0 (20)	16
Carcinome colorectal	46	0	13	17	11	22	0 (20)	11
Carcinome rénal	44	5	0	0	2	0	0 (20)	0
Leucémie	112	0	0	0	1	0	0 (25)	0
Myélome								
-stades I-II	11	0	0	0	0	0	0 (11)	0
-stade III	27	30	19	31	12	33	7 (27)	15

¹Expression mesurée par RT-PCR sur de l'ARN total avec des amorces spécifiques de chaque gène

²Nombre d'échantillons testés pour les gènes *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A6* et *A12*

³Nombre d'échantillons testés pour le gène *MAGE-A10* indiqué entre parenthèse

D'après Francis Brasseur (communication personnelle).

Tableau 1.3
Peptides utilisés pour la vaccination^a

				Gene	HLA	Peptide	Position
	V54	LEDDGEZEE	81-102				
	V54	IMBKVCIT	182-303				
	V5	KAVEGANE	115-150				
MVCE-V3	V5	EGWCBVGL	511-518	CYCE-3 10 1	V58	LLMVBVBKL	10-18
	V1	EADYCHGL	108-110	CYCE-1'5'8	C ⁴⁰	LBVBVBKL	8-10
	DB13	ITKLVVBELKVE	151-134	BVCE	C ⁴¹⁰	VAVVLEGL	5-10
	B31	BEELKVEML	151-130		DB13	VEGANEITTKLVVB	114-151
MVCE-V5	V54	EAGOGAEIE	120-102				
	V5	AGOGAEIEA	121-100				
	DB12	EALIKAZVBAE	581-585		C ⁴¹	ABICHGLI	110-118
	DB13	ITKLVVBELKVE	114-151	MVCE-V15	V5	EGWCBVGL ₄	511-518
MVCE-V1	C ⁴¹⁰	ZVLCBVK	530-538		B23	DBVLEELM	580-588
	C ⁴³	ZVLCBVK	530-538		V5	GLDCWENL	524-505
	C ⁴⁵	ZVBLLE	05-10				
	B23	DBVLEELM	528-500				
	B31	BEELKVEML	151-130		DB13	ITKLVVBELKVE	151-134
	B32	EADYCHGL	101-100		C ⁴¹⁰	ICCBKGL	588-303
	B1	KVLEEL	588-588		B31	BEELKVEML	151-130
	V58	EALDCWENZV	555-531	MVCE-V0	V34	MLKICCBK	580-588
	V54	ILKNCBEI	132-143				
	V3	ZLEVALLK	80-104	MVCE-V4	V5	GLDCWENL	530-538
	V1	EADYCHGL	101-100				
Gene	HLA	Peptide	Position				
	DB*0401	LONELOEILGEA	541-528				
	DB11	LZAAKALGHHMLKICG	581-582				
	DB13	ITKLVVBELKVE	151-134				
	DB13	VEGANEITTKLVVB	114-151				
	B44	WEADYCHGL	101-110				
	B00	VEGANEIT	114-155				
	B31	BEELKVEML	151-130				

^a La séquence peptide antigénique dépend du gène codant la protéine dont il dérive et de la molécule HLA le présentant en surface.

Tableau 1.4

Comparaison des homologies existant entre les séquences des sondes capteurs *MAGE-A* et les séquences cibles *MAGE-A*^a

Séquence d'ADN cible des gènes *MAGE-A*

Sondes capteurs	A1	A2	A3	A4a	A5a	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
MAGE-A1	100	59	70	70	67	67	41	48	41	41	44	63
MAGE-A2	59	100	81	59	63	78	33	44	33	37	44	78
MAGE-A3	70	74	100	70	74	96	59	67	67	63	70	89
MAGE-A4	70	67	70	100	85	67	37	48	41	15	37	63
MAGE-A5	67	74	81	81	100	85	30	41	33	15	26	70
MAGE-A6	92	92	88	88	85	100	70	88	74	78	81	92
MAGE-A7	52	48	55	48	48	55	100	70	63	37	52	44
MAGE-A8	52	48	55	48	48	52	70	100	74	48	59	48
MAGE-A9	48	41	52	44	44	48	63	74	100	33	48	48
MAGE-A10	37	48	48	55	48	52	44	44	37	100	67	44
MAGE-A11	44	48	48	55	48	44	52	55	48	67	100	41
MAGE-A12	63	74	78	63	67	78	59	70	74	33	52	100

^aLes données sont le pourcentage d'identité des nucléotides entre les séquences sondes et les séquences cibles pour les douze gènes *MAGE-A* (Zammatteo et al., 2002b).

Tableau 1.5

Paramètres servant à l'évaluation d'un test de diagnostic
basé sur une méthode d'amplification

		Statut réel	
		Positif	Négatif
	Résultat du test		
	Positif	a	b
	Négatif	c	d
Paramètre	Formule	Définition	
Sensibilité	$a/(a+c)$	Capacité du test d'identifier les individus réellement positifs	
Spécificité	$d/(d+b)$	Capacité du test d'identifier les individus réellement négatifs	
Valeur prédictive positive	$a/(a+b)$	Probabilité qu'un résultat positif soit réellement positif	
Valeur prédictive négative	$d/(c+d)$	Probabilité qu'un résultat négatif soit réellement négatif	
Faux positif	b	Résultat positif d'un échantillon réellement négatif	
Faux négatif	c	Résultat négatif d'un échantillon réellement positif	

2. Matériels et méthodes

2.1 Extraction d'ARN et rétrotranscription

2.1.1 Clones ADNc, lignée cellulaires tumorales et tissus

Les clones d'ADNc correspondant à *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A5*, *A6*, *A8*, *A9*, *A10*, *A11*, *A12* et *MAGE-D2* ainsi que les lignées cellulaires tumorales MZ2-MEL.3.0, LB1751-MEL, LB373-MEL (mélanomes), LB905-BLC (cancer de la vessie) proviennent de l'Institut Ludwig de Bruxelles. Les échantillons de tissus tumoraux (deux mélanomes, deux carcinomes épidermoïdes de la sphère ORL, un échantillon recto-colique) ont été collectés après résection. Ils ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN.

2.1.2 Extraction d'ARN et d'ADNg

L'ARN total de lignées cellulaires issues de mélanomes ainsi que les tissus tumoraux issus de mélanomes sont isolés par la méthode isothiocyanate de guanidinium/chlorure de césium (GITC/CSCL) de Davis et al. (Basic methods in molecular biology, pp 130-135, Elsevier, New-York, 1986). Cette méthode purifie l'ARN total par sédimentation à travers un gradient de chlorure de césium, suivi par une extraction phénol-chloroforme et une précipitation à l'éthanol.

L'ARN total de lignées cellulaires qui ne sont pas issues de mélanomes ainsi que les tissus tumoraux autres que les mélanomes sont isolés par une méthode d'une étape développée par Chomczynski et Sacchi (Anal. Biochem., 162 : 156-159, 1987) utilisant TriPure Isolation Reagent (Roche) ou le réactif TRIzol (Gibco Brl). Cette méthode ne peut être utilisée pour isoler l'ARN total des cellules pigmentées de mélanomes car la mélanine co-précipite avec l'ARN et inhibe la réaction de RT-PCR.

Afin de prévenir la dégradation de l'ARN :

- porter des gants tout au long de la procédure
- utiliser du matériel stérile jetable si possible et du verre autoclavé
- utiliser uniquement de l'eau dépourvue de Rnase
- nettoyer tous les instruments, micropipettes, plan de travail avec du SDS 1%

L'ADNg est extrait à partir de sang total d'un patient normal grâce au kit QIAamp DNA Blood (QIAGEN).

Les extractions d'ARN et d'ADNg ont été effectuées à l'Institut Ludwig de Bruxelles.

2.1.3 Rétrotranscription

Matériel

- « Moloney murin leukemia virus » (M-MLV) transcriptase inverse (Gibco Brl-Life Technologies, Belgique)
- Tampon transcriptase inverse 5x (Gibco Brl-Life Technologies, Belgique)
- dNTPs
- RNasin (Promega, USA)
- Dithiothréitol (DTT) (Gibco Brl-Life Technologies, Belgique)

- oligo-(dT)15
- DEPC (Sigma, USA)
- Eau traitée au DEPC

Méthode

La rétrotranscription est réalisée à partir de 2 µg d'ARN total.

Le mélange de rétrotranscription doit être préparé sur glace.

Réactifs	Volume par réaction de rétrotranscription
Tampon transcriptase inverse 5x	4 µl
10 mM dATP	1 µl
10 mM dCTP	1 µl
10 mM dGTP	1 µl
10 mM dTTP	1 µl
RNasin, 40 U/µl	0,5 µl
100 mM Dithiothréitol	2 µl
20 µM amorce (dT)15	2 µl
M-MLV transcriptase inverse, 200 Unités/µl	1 µl
ARN cible (2 µg d'ARN total)	6,5 µl
Volume total	20 µl

- mélanger
- incuber pendant 90 minutes à 42°C
- placer sur glace
- ajouter 80 µl d'eau distillée
- mélanger
- stocker l'ADNc à -20°C jusqu'à utilisation

Les rétrotranscriptions ont été effectuées à l'Institut Ludwig de Bruxelles.

2.2 Réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

2.2.1 Principe

La PCR est une méthode enzymatique qui permet l'amplification exponentielle et spécifique d'une séquence d'ADN donnée (Mullis and Faloona, 1987). Elle doit son succès à l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable. Différents paramètres déterminent l'efficacité de cette réaction : le tampon de réaction, les amorces préalablement choisies, les déoxynucléotides triphosphates (dNTP), le type d'ADN polymérase et la température d'hybridation des amorces. La PCR comprend un enchaînement de cycles successifs constitués de trois étapes, chacune s'effectuant à une température particulière (figure 2.1).

La première étape consiste en la dénaturation de la molécule d'ADN cible. Les deux brins de la double hélice sont séparés grâce à une élévation de la température et cela permet l'accès des amorces à leurs séquences complémentaires.

La deuxième étape est l'hybridation des amorces avec leur séquence complémentaires sur l'ADN simple brin. Les sites d'hybridation délimitent la séquence qui sera amplifiée.

L'ADN polymérase peut se fixer aux amorces hybridées en position 3' et initier la synthèse du brin complémentaire de la molécule d'ADN cible. Cette élongation constitue la troisième étape du cycle PCR. L'ADN Taq polymérase est une enzyme extraite d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*. Elle intervient dans la répllication et la réparation de l'ADN, sa température d'activité optimale est de 72°C.

L'étape de dénaturation se déroule, selon un protocole standard, à 94°C. La température d'hybridation des amorces se situe entre 40 et 65°C. L'extension par la polymérase s'effectue à la température d'activité maximale de l'enzyme, 72°C. Le cycle est répété de 25 à 45 fois afin d'obtenir un assez grand nombre de copies de la molécule voulue.

Une dénaturation initiale de 3 à 5 minutes à 94°C est réalisée avant le premier cycle. A la fin du dernier cycle, le mélange réactionnel est porté 10 minutes à 72°C afin d'achever la synthèse de tous les brins. 30 à 40 cycles permettent d'amplifier plus d'un million de fois une séquence d'ADN particulière. Cette amplification est facilitée grâce à l'utilisation d'automates spécialisés ou « thermocycler ».

Des amplicons se retrouvent dans l'air sous forme d'aérosol lors de l'ouverture des tubes après PCR. Ils se déposent sur les tables de travail, les tabliers, les gants et risquent de contaminer d'autres PCR.

Les différentes étapes de la manipulation sont réalisées dans des pièces séparées afin d'éviter ces contaminations. En pièce PCR 1, on effectue le mélange des réactifs à l'exception de l'ADN cible. En pièce PCR 2, on ajoute l'ADN à amplifier. Après amplification, les tubes contenant les amplicons doivent être ouverts sous hotte en pièce PCR 3.

Pour vérifier si une contamination a eu lieu en pièce PCR 1 ou 2, des blancs sont réalisés. On prépare des tubes dans lesquels l'ADN cible est remplacé par de l'eau distillée ajoutée dans ces deux pièces et l'électrophorèse sur gel d'agarose permettra de détecter d'éventuelles contaminations.

2.2.2 Amplification des séquences d'ADNc des gènes *MAGE-A* par l'utilisation d'amorces spécifiques

Cette méthode est utilisée à l'Institut Ludwig de Bruxelles pour déterminer le pattern d'expression des gènes *MAGE-A* pour un échantillon donné.

L'amplification par PCR est réalisée avec 2,5 µl (1/40) de la solution d'ADNc obtenue suite à la rétrotranscription, 0,625 unités (U) d'ADN Taq polymérase (Takara), 0,4 µM de chaque amorce et 100 µM de chaque dNTP (Takara) dans un volume final de 25 µl. Les paires d'amorces spécifiques utilisées et le programme d'amplification de chaque gène *MAGE-A* sont décrits par De Plaen et al. et van Baren et al. Les amorces sont choisies dans des exons différents afin d'éviter des résultats faux-positifs causés par une contamination de l'ARN extrait par de l'ADNg. La PCR est réalisée en 30 cycles excepté pour les séquences d'ADNc des gènes *MAGE-A5*, *A7*, *A8*, *A9*, *A11* et *A12* qui sont amplifiées en 32 cycles. Après amplification, les produits PCR sont identifiés par électrophorèse.

Cette approche est semi-quantitative. Le niveau d'expression des gènes dans l'échantillon est comparé à celui des gènes *MAGE-A* dans des lignées cellulaires de référence MZ2-MEL et LB373-MEL issues de mélanomes et TT issu de carcinome de la médullaire thyroïdienne. La lignée MZ2-MEL exprime *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A6*, *A10* et *A12*, la lignée TT exprime *MAGE-A8* et la lignée LB373-MEL exprime les autres *MAGE-A*. L'ADNc produit à partir de différentes quantités d'ARN total extrait de ces lignées (2 µg, 0.2 µg, 0.06 µg et 0.02 µg) est amplifié avec les amorces spécifiques du gène *MAGE-A* considéré. Le niveau d'expression des gènes *MAGE-A* d'un échantillon donné sera évalué par comparaison de l'intensité des bandes obtenues sur gel avec celles obtenues pour les amplicons d'ADNc issu de lignées cellulaires tumorales de référence (De Plaen et al., 1994).

2.2.3 Amplification des séquences d'ADNc des gènes *MAGE-A* par une PCR triplex

La méthode de PCR triplex permet d'amplifier plusieurs séquences d'ADN différentes simultanément avec plusieurs couples d'amorces. Dans le cas des gènes *MAGE-A*, l'amplification de tous ces gènes et du contrôle endogène dépendra de trois couples d'amorces (consensus *MAGE-A*, *MAGE-A3* et *MAGE-D2*) ainsi que 4 amorces sens spécifiques pour les gènes *MAGE-A1*, *A8*, *A11* et *A12* (tableau 2.1). Ces amorces sens spécifiques sont situées au même endroit que l'amorce consensus sens. Les concentrations des différentes amorces doivent être ajustées afin d'obtenir une efficacité d'amplification suffisante pour chacune des séquences.

Les produits PCR sont marqués pour permettre par la suite la détection colorimétrique des hybrides sur microdamier. Ce marquage est effectué par l'incorporation de nucléotides biotinylés, ici on utilisera des dATP et dCTP biotinylés.

2.2.3.1 Matériel

- Tampon 10x avec MgCl₂ pour la Taq polymérase BIOTOOLS (Labsystems, Espagne)
- ADN Taq polymérase BIOTOOLS 1U/µl (Labsystems, Espagne)
- MgCl₂ 25mM (Perkin Elmer, USA)

- dNTP 100mM (Roche, Allemagne)
- Biotin-11 -dATP (Perkin Elmer, USA)
- Biotin-11 -dCTP (Perkin Elmer, USA)
- Amorce 200 μ M (Eurogentec, Belgique)
- Les séquences des différentes amorces sont reprises dans le tableau 2.1
- Eau distillée
- ADNc ou ADN plasmidique
- Tube strips 0,2 ml (BIOplastics)
- Tips avec filtre (Greiner Bio-One, Autriche)
- Appareil PCR Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer, USA)

2.2.3.2 Méthode

Pièce PCR 1 : mélange des réactifs

Il est important de porter des gants et un tablier à chaque étape afin d'éviter les contaminations. La PCR est réalisée dans un volume final de 25 μ l.

- resuspendre les 10 amorces dans 25 μ l d'eau distillée
- réaliser le mélange suivant :

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction PCR
Eau distillée	/	0,625 μ l
Tampon 10x	1x	2,5 μ l
dATP (10 mM)	150 μ M	0,375 μ l
dCTP (10 mM)	150 μ M	0,375 μ l
dGTP (10 mM)	200 μ M	0,5 μ l
dTTP (10 mM)	200 μ M	0,5 μ l
Biotin- dATP (1 mM)	10 μ M	0,25 μ l
Biotin- dCTP (1 mM)	10 μ M	0,25 μ l
DPSCONS2	0,25 μ M	1 μ l
DPSMAGE1	0,25 μ M	1 μ l
DPSMAG8	0,25 μ M	1 μ l
DPSMAG11	0,25 μ M	1 μ l
DPSMAG12	0,25 μ M	1 μ l
DPASCONB4	1 μ M	1 μ l
DPSA3	4 μ M	4 μ l
DPASA3	4 μ M	4 μ l
DPSD2	0,5 μ M	1 μ l
DPASD2	0,5 μ M	1 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	0,5 mM	0,5 μ l
ADN polymérase 1U/ μ l	0,6 U/25 μ l	0,625 μ l
ADNc*		/
Volume final		25 μ l

* L'ajout de 2,5 μ l l'ADNc est réalisé en pièce PCR 2.

Distribuer 22,5 μ l du mélange par microtube PCR et ajouter 2,5 μ l d'eau distillée dans le tube blanc PCR 1 (contrôle pour les contaminations en pièce PCR 1).

Pièce PCR 2 : ajout de l'ADN cible

- Diluer les échantillons si nécessaire
- ajouter 2,5 µl d'ADNc (1/40 du produit de rétrotranscription) ou de plasmide (1 ng/µl) par tube
- ajouter 2,5 µl d'eau distillée dans le tube blanc PCR 2 (contrôle pour les contaminations en pièce PCR 2).

Démarrer le programme de PCR

Les tubes sont placés dans l'appareil programmé comme suit :

- 5 minutes à 94°C
- 35 cycle

{	- 30 secondes à 94°C
	- 30 secondes à 65°C
	- 30 secondes à 72°C
- 10 minutes à 72°C
- arrêt de la réaction, placer les tubes à 4°C

Le programme est lancé. Après amplification les tubes devront être ouverts sous hotte en pièce PCR 3.

2.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

2.3.1 Principe

La vérification de la taille des amplicons et l'absence de contamination s'effectue par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette technique permet la séparation de fragments d'ADN en fonction de leurs tailles. Le gel est constitué d'un polymère d'agarose. Le pourcentage d'agarose définit la structure du gel, un haut pourcentage sera utilisé pour séparer de petits fragments d'ADN avec une résolution suffisante et un faible pourcentage suffira à la séparation de fragments plus grands.

A pH presque neutre, les molécules d'ADN sont chargées négativement par leurs groupements phosphate. Déposées sur un gel placé dans un champ électrique, elles vont migrer à travers celui-ci vers l'électrode positive. La vitesse de migration va dépendre de la taille des fragments d'ADN, du voltage appliqué et la concentration en agarose. Des fragments de petite taille migreront plus facilement et rapidement, ils seront ainsi séparés des plus grands.

L'ADN est déposé dans les puits du gel avec une solution colorée. Elle sert à alourdir l'échantillon pour qu'il tombe au fond du puits et à visualiser le front de migration durant l'électrophorèse.

Pour visualiser les bandes d'ADN sur le gel, on utilise du bromure d'éthidium. Cette molécule fluorescente s'intercale entre les bases de l'ADN. Elle absorbe les rayonnements ultra-violet à 320 nm et réémet à 590 nm dans la région rouge-orange du spectre visible.

On vérifie la taille de l'échantillon amplifié en le faisant migrer simultanément avec un étalon de poids moléculaire (figure 2.2). On peut connaître la taille en paires de base de chaque bande de l'étalon utilisé. La taille de l'échantillon d'ADN correspondra à celle de l'étalon ayant migré à la même hauteur.

Pour évaluer la concentration du produit amplifié, on effectue une électrophorèse semi-quantitative. On fait migrer en parallèle différentes dilutions des amplicons et plusieurs concentrations d'un étalon (figure 2.3). On compare ensuite l'intensité des bandes obtenues pour l'échantillon et pour l'étalon. On obtient différentes valeurs et en reportant les facteurs de dilution on peut établir une moyenne. On connaît ainsi approximativement la quantité d'ADN présente dans l'échantillon après PCR.

2.3.2 Matériel

- Agarose electrophoresis grade (Gibco Brl, USA)
- Tampon TBE 10x (Invitrogen) de composition :
 - Tris-HCl 1M
 - Acide borique 0,9 M
 - EDTA 0,01 M
- Bromure d'éthidium 500 µg/ml (Sigma, USA)
- Solution alourdisseur/colorant : Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega, USA)
- Etalon de poids moléculaire : 100 bp DNA Ladder (Promega, USA) et Smart Ladder (Eurogentec, Belgique)

- Etalon de poids moléculaire : Low DNA Mass Ladder (Invitrogen)
- Produits PCR
- Cuve d'électrophorèse Horizon (Gibco Brl, USA) (figure 2.4)
- Générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Suède)
- Lampe ultra-violet (Vulber-Lourmat, France)
- Appareil photo Kaiser RA1 (Buchen, Allemagne) + photo-print IP-001-SD (Vulber-Lourmat, France)
- Film K65HM (Mitsubishi, Japon) + imprimante P91 (Mitsubishi, Japon)

2.3.3 Méthode

2.3.3.1 Préparation du gel d'agarose 1,3%

Des gants et un tablier doivent être portés car le bromure d'éthidium est mutagène.

- Peser l'agarose : 1,3g pour 100 ml de TBE 1x
- Diluer l'agarose dans le volume de TBE 1x voulu
- Chauffer le mélange jusqu'à obtenir une solution limpide
- Laisser un peu refroidir
- Ajouter 15 µl de bromure d'éthidium pour 100 ml de TBE 1x
- Couler le gel dans le portoir
- Ajouter les peignes correspondant au volume du puits désiré
- Attendre la polymérisation du gel

2.3.3.2 Préparation des échantillons

Electrophorèse qualitative :

Echantillon : - 3 µl de produit PCR
- 7 µl d'eau distillée
- 2 µl de bleu

Etalon : - 10 µl 100bp DNA Ladder
- 2 µl de bleu

Electrophorèse semi-quantitative :

Echantillon : - 2 µl de produit PCR
dilué ou non dilué
- 8 µl d'eau distillée
- 2 µl de bleu

Etalon : - 1 µl, 2µl ou 4 µl Low DNA
Mass Ladder
- 9 µl, 8 µl ou 6 µl d'eau
distillée
- 2 µl de bleu

2.3.3.3 Migration des échantillons

- Enlever les peignes sans abîmer le gel
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec du tampon TBE 1x
- Déposer le portoir dans la cuve d'électrophorèse
- Déposer les échantillons et l'étalon dans les puits
- Laisser migrer 45 minutes à 100 volts

2.3.3.4 Visualisation des échantillons

- Eteindre le générateur et enlever le portoir de la cuve
- Déposer le gel sur le banc ultra-violet après l'avoir égoutté
- Allumer l'écran, le moniteur et l'imprimante
- Prendre une photo après la mise au point de l'image et l'imprimer

2.4 Fabrication des microdamiers

2.4.1 Principe

La fabrication des microdamiers consiste en l'immobilisation covalente des sondes capteurs sur lame de verre, fonctionnalisée avec des aldéhydes. Les sondes capteurs sont des oligonucléotides dont la séquence est complémentaire de la séquence des ADN cibles amplifiés par PCR (*MAGE-A*, *MAGE-A3* et *MAGE-D2*). On fixe également des sondes biotinylées, qui serviront de contrôle lors de la détection, des contrôles positif et négatif des conditions d'hybridation, le premier ayant un ADN complémentaire biotinylé ajouté au mélange d'hybridation et le second non. Le design du damier MAGEchip est présenté à la figure 2.5 et les séquences des sondes dans le tableau 2.2.

Une fonction amine est ajoutée à l'extrémité des sondes lors de leur synthèse. Une liaison covalente imine va se former entre cette fonction et la fonction carbonyle de l'aldéhyde présente sur le support (figure 2.6).

Les sondes capteurs sont déposées sur le support par l'intermédiaire d'un robot. En plaque multipuits on prépare les différentes solutions de sondes capteurs et contrôles. L'aiguille prélève dans chaque puits un volume de l'ordre du nanolitre et le dépose en un point précis de la lame. L'aiguille est lavée entre les dépôts d'ADN afin de la décontaminer. Le design du microdamier est défini au préalable et le robot est programmé en fonction du puits où il faut prélever la solution, l'endroit du dépôt ou spot, l'espace voulu entre les spots, le nombre de lames et de damiers par lame souhaité. En général, une même sonde est déposée en triplicats car certains spots peuvent être abîmés lors des manipulations, on tient également compte ainsi de la variabilité de signal existant d'un spot à l'autre. On pourra faire, après révélation, une moyenne de l'intensité des pixels pour chaque groupe de réplicats et obtenir une valeur la plus proche possible du signal réel.

2.4.2 Matériel

- Bobby robot (WOW, Belgique)
- Aiguille de 250 μm de diamètre (Genetix, Angleterre)
- Espace entre les spots de 400 μm
- Lames DIAGLASS (EAT, Belgique)
- 384 well plate Clear Stérile (NUNC International, USA)
- Portoir métallique pour lames de microscope d'une capacité de 100 lames (Merck, Allemagne)
- ADN capteur aminé en 5' (Eurogentec, Belgique)
- Solution de spotting 1 (EAT, Belgique)
- Solution de spotting 2 (EAT, Belgique)
- SDS 10% (Merck, Allemagne)
- Borohydrure de sodium (NaBH_4) AF granules (Aldrich Chemical, USA)
- PBS : - $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 10 mM pH 7,4 (Merck, Allemagne)
- NaCl 0,9% (Merck, Allemagne)
- Ethanol 95% (Carlo Erba reagenti, Italie)
- Eau distillée

2.4.3 Méthode

2.4.3.1 Préparation des solutions de fixation

La préparation des solutions de fixation comportant l'ADN capteur aminé est réalisé suivant le protocole décrit dans le kit Diaglass (EAT, Belgique).

Les sondes capteurs et les différents contrôles sont ensuite transférés dans les puits de la microplaque 384 puits en évitant de faire des bulles.

2.4.3.2 Fixation proprement dite

- Mettre de l'eau distillée dans les bacs de rinçage du robot
- Déposer la plaque de 384 puits qui contient les solutions d'ADN capteurs sur le robot
- Déposer les lames fonctionnalisées sur le robot
- Programmer l'ordinateur selon le design défini
- Démarrer le robot
- A la fin du spotting les lames doivent être incubées une heure à température ambiante avant d'effectuer les lavages

2.4.3.3 Lavages

Ces lavages sont effectués afin de stabiliser les liaisons établies et d'éliminer ce qui n'est pas fixé de façon covalente. Cinq types de lavages sont réalisés en immergeant le portoir contenant les lames dans un bac de verre d'une capacité de deux litres.

- Numéroté les lames spottées
- Déposer les lames sur le portoir
- Laver les lames 2 minutes dans une solution de SDS 0,2%

Le SDS permet de décrocher les molécules d'ADN non fixées.

- Laver deux fois 2 minutes dans de l'eau distillée
- Laver 5 minutes avec une solution contenant 2,5 mg/ml de NaBH_4 dans un mélange contenant 75% de PBS et 25 % d'éthanol 95 %

Le NaBH_4 stabilise la liaison covalente en transformant l'imine en amine et inactive les aldéhydes qui n'ont pas réagi avec les ADN capteurs aminés en les réduisant en fonctions alcools.

- Laver 2 minutes dans de l'eau distillée
- Laver 3 minutes dans de l'eau distillée bouillante

L'eau bouillante élimine toute liaison non-covalente, liaison électrostatique ou autre.

- Sécher les lames
- Stocker les lames à 4°C

2.5 Hybridation sur microdamier et détection en colorimétrie

2.5.1 Principe

La réaction d'hybridation repose sur la capacité que possède l'ADN simple brin de se réassocier à sa séquence complémentaire.

La première étape de cette réaction consiste en l'association de quelques bases complémentaires résultant de collisions au hasard. C'est l'étape de nucléation. La seconde étape est la propagation de la zone de liaison aux bases complémentaires adjacentes, les deux brins vont se refermer telle une fermeture éclair (figure 2.7).

L'hybridation sur microdamier consiste en l'association de l'ADN cible simple brin avec la séquence sonde, fixée sur le support solide, qui lui est complémentaire. La vitesse de la réaction d'hybridation dépend de plusieurs facteurs comme la température, la force ionique, la concentration en sondes capteurs, la quantité d'ADN cible, le nombre de mésappariements, etc.

La température est en général choisie 15 à 25°C sous la température de melting (T_m), température à laquelle 50% des molécules d'ADN sont dissociées (figure 2.8). En effet, c'est 15 à 25 °C sous T_m que la vitesse d'appariements des brins d'ADN atteint son plateau maximum (figure 2.9). La T_m est fonction de la taille de la séquence d'ADN et du pourcentage de liaisons G-C de la séquence cible. En effet, ces liaisons qui comprennent trois liaisons hydrogènes sont plus stables que les liaisons A-T qui n'en comportent que deux.

Lorsque l'on travaille avec des séquences cibles qui ont un pourcentage d'identité élevé, il faut éviter les hybridations croisées. Il est conseillé d'hybrider à une température proche du T_m et/ou d'augmenter la stringence des lavages, c'est-à-dire de diminuer la concentration en sels (figure 2.10). Ainsi dans cet exemple, si l'on veut éviter les hybridations croisées pour des séquences ayant 80% à 90% d'identité avec la séquence recherchée, on choisira une température d'hybridation de 85°C, c'est-à-dire 10°C sa T_m .

La force ionique va influencer la vitesse de réaction car l'ADN à pH neutre est chargé négativement via ses groupements phosphates. Les sels (cations) ont un effet positif sur l'hybridation car ils neutralisent les charges négatives de l'ADN et ainsi les brins s'associent plus rapidement (figure 2.9).

Si des mésappariements existent entre les deux séquences, cela va affecter la T_m et la vitesse d'hybridation. On estime que chaque pourcentage de mésappariement diminue la T_m de 1°C.

Une concentration élevée en sondes capteurs permet d'obtenir une réaction cinétique de pseudo-premier ordre pour l'hybridation. Le taux d'hybridation dépendra majoritairement de la concentration en cible déposée sur le microdamier. Si durant le spotting apparaissent de petites variations dans la quantité de sonde capteur déposée, la vitesse de la réaction d'hybridation n'en sera pas affectée.

Si l'ADN cible est sous forme double brin, ce qui est le cas quand il y a eu amplification PCR, il faut une étape de dénaturation avant l'hybridation. Un pH alcalin, la chaleur ou un détergent peuvent dénaturer la molécule d'ADN.

On réalise donc un mélange pour l'hybridation comprenant :

- le produit PCR biotinylé provenant de l'échantillon
- un contrôle d'hybridation positif, il s'agit d'ADN biotinylé dont la séquence n'a aucune similitude avec l'ADN recherché et dont la sonde complémentaire est fixée sur le damier
- un agent dénaturant pour obtenir de l'ADN cible simple brin
- un tampon équilibrant la réaction

Une chambre d'hybridation est posée autour du damier, le mélange y est déposé. La chambre est alors scellée et la lame est incubée à une température idéale pendant un temps déterminé. Une série de lavages sera réalisée après hybridation pour éliminer l'ADN non hybridé.

L'étape suivante est la détection des hybrides formés, ici cette détection est réalisée en colorimétrie. Les lames sont incubées dans une solution de conjugué anticorps anti-biotine couplé à de l'or colloïdal en présence d'agent bloquant. Cet agent sature la lame et empêche le conjugué de s'y fixer de façon non spécifique.

Le conjugué va se fixer aux molécules de biotine incorporées pendant la PCR. L'excès de conjugué est éliminé par une série de lavages.

L'or colloïdal catalyse la précipitation d'argent métallique (Ag^0) quand il est mis en présence de sels d'argent (Ag^+) et d'un réducteur (figure 2.11). Un dépôt noir apparaît aux endroits de formation des hybrides sondes/ADN cible. Le résultat de l'hybridation est alors visible à l'œil nu. L'image obtenue peut être digitalisée à l'aide d'un scanner et les spots peuvent être quantifiés ou détectés par des programmes spécifiques.

2.5.2 Matériel

- Lames de verre spottées
- Chambre d'hybridation (Advanced Biotechnologies, Angleterre)
- Boîte de pétri (Stardtest, Allemagne)
- Four à hybridation : Hybridiser HB-1D (Techne Duxford, Angleterre)
- Porte lame et bac en verre (Merck, Allemagne)
- Produits PCR biotinylés
- Contrôle d'hybridation positif 50 nM
- NaOH 10 N (Merck, Allemagne)
- Tampon phosphate $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,6 M pH 7,4 (Merck, Allemagne)
- Tampon B4 pH 7,5 (EAT, Belgique)
- Tween 20 (Sigma, USA)
- Lait demi-écrémé en poudre 0,1% de matière grasse (Gloria, Nestlé)
- Antibiotine-or (BBInternational)
- Transparents (Stabilo, Allemagne)
- Solutions de révélation Silver Blue A et B (EAT, Belgique)

- Tampon citrate 0,47 M pH 4,4 : - 55,3 g/l d'acide citrique (Merck, Allemagne)
(MM = 210,1 g/mole)
- 60,8 g/l de citrate de sodium (Merck, Allemagne)
(MM = 294 g/mole)
- Eau distillée
- Boîtes de révélation : - white staining box, contenance 5 lames (Merck, Allemagne)
- blue staining box, contenance 2 lames (labo Moderne, France)
- Scanner Silverquant 6000 (Eppendorf, Allemagne)
- Programme Microtek ScanWizard Pro TX V6.01 e6

2.5.3 Méthode

2.5.3.1 Préparation du mélange d'hybridation

Le volume final du mélange est de 70 µl :

- 5 µl de contrôle d'hybridation positif à 50 nM
- 20 µl de produit PCR biotinylé
- 10 µl de NaOH 0,175 N
- incuber 5 minutes à température ambiante (pendant l'incubation vortexer et centrifuger brièvement à 1300 r/min)
- 35 µl de tampon phosphate 0,6 M pH 7,4 (servant à neutraliser le NaOH)

2.5.3.2 Hybridation

- mettre les chambres d'hybridation autour des damiers et enlever les papiers adhésifs
- déposer 70 µl du mélange d'hybridation dans la chambre et fermer avec le couvre objet
- déposer les lames dans des boîtes de pétri
- incuber les lames pendant 30 minutes à 65°C dans un four à hybridation
- pendant l'hybridation préparer les tampons de lavage et le tampon bloquant :
 - Tampon B1 pH 7,5 : tampon B4 pH 7,5 dilué 4x
 - Tampon de lavage post-hybridation : tampon B1 pH 7,5 dilué 500x
 - Tampons de lavage post-conjugué : tampon B1 pH 7,5 dilué 10x + Tween 0,1%
tampon B1 pH 7,5 dilué 200x
 - Tampon bloquant : tampon B1 pH 7,5
lait gloria 0,1 mg/ml
- après l'incubation, enlever les couvre-objets et les chambres d'hybridation
- plonger immédiatement les lames dans le tampon de lavage post-hybridation placé dans le bac de lavage
- effectuer 4 lavages de 2 minutes

NB : veiller à ne laisser sécher les lames à aucun moment

2.5.3.3 Révélation des lames

- diluer 200x le conjugué antibiotine-or dans le tampon bloquant
- déposer 800 µl/lame de la solution de conjugué sur un transparent

- déposer la lame dans la goutte de solution avec le damier face au transparent en veillant à ne pas introduire de bulles
- incuber dans l'obscurité 45 minutes à température ambiante
- à la fin de l'incubation, on plonge les lames dans le tampon de lavage post-conjugué B1 dilué 10x + Tween 0,1 %
- effectuer 3 lavages de 2 minutes dans le tampon de lavage post-conjugué B1 dilué 10x + Tween 0,1 %
- effectuer 2 lavages de 2 minutes dans le tampon de lavage post-conjugué B1 dilué 200x
- lors du dernier lavage, on mélange les solutions de révélation Silver Blue A et B volume 1/1 pour obtenir le volume nécessaire pour remplir la boîte de révélation
- placer les lames dans la boîte de révélation et la remplir avec la solution de révélation
- incuber 10 minutes à température ambiante
- laver les lames dans de l'eau distillée pendant 2 minutes
- laisser sécher les lames à température ambiante. Les lames sont prêtes à être scannées

2.6 Numérisation des damiers

Le scanner Silverquant 6000 (Eppendorf, Allemagne) et le logiciel Microtek ScanWizard Pro TX V6.01 e6 permettent la numérisation des microdamiers révélés en colorimétrie. Les images peuvent alors être sauvegardées sur le disque dur et être importées dans d'autres applications. Marche à suivre :

- allumer le scanner
- ouvrir le programme
- insérer la lame dans le support
- insérer le support bien horizontalement dans le scanner
- pré-scanner le damier
- délimiter la zone de numérisation de l'image
- demander la numérisation
- enregistrer l'image en format tif
- l'image peut alors être mise en page dans une application telle que Power point

2.7 Quantification/détection des signaux

L'analyse des microdamiers par le scanner et le programme Imachips (WOW, Belgique) permet une quantification des signaux issus d'hybridations positives. A partir de l'image scannée, le programme donne un nombre de pixels moyens aux différents spots du damier (figure 2.12). Le calcul du bruit de fond local autour de chaque spot est également réalisé.

Le transfert de ces données dans l'application Excel permet de :

- soustraire le bruit de fond local de chacun des spots
- calculer la moyenne et les écarts-types de l'intensité en pixels des répliquats de chaque sonde (figure 2.13)
- porter en graphique la moyenne et les écarts-types (figure 2.14)

Ce programme peut également effectuer une détection de type oui ou non en choisissant un seuil au delà duquel le spot sera détecté. Le programme utilise trois spots délimitant le damier comme références. Les spots du damier vont être corrélés avec ces trois spots. Chaque

spot recevra une valeur de corrélation comprise entre 0 et 1. Les spots ayant une valeur de coefficient de corrélation supérieure à celle définie comme seuil seront détectés par le programme. Toutes les analyses ont été effectuées avec un seuil de détection fixé à une valeur de coefficient de corrélation de 0,25. Les réplicats des contrôles sont préalablement analysés, les trois spots doivent être détectés pour chacun d'eux à l'exception du contrôle d'hybridation négatif pour lequel aucun spot ne doit être détecté. L'analyse du reste du damier ne sera effectuée que si les contrôles de détection, d'hybridation et le contrôle endogène sont corrects, le signal pour un gène *MAGE-A* sera considéré comme détecté si deux des trois réplicats se situent au-dessus du seuil (figure 2.15).

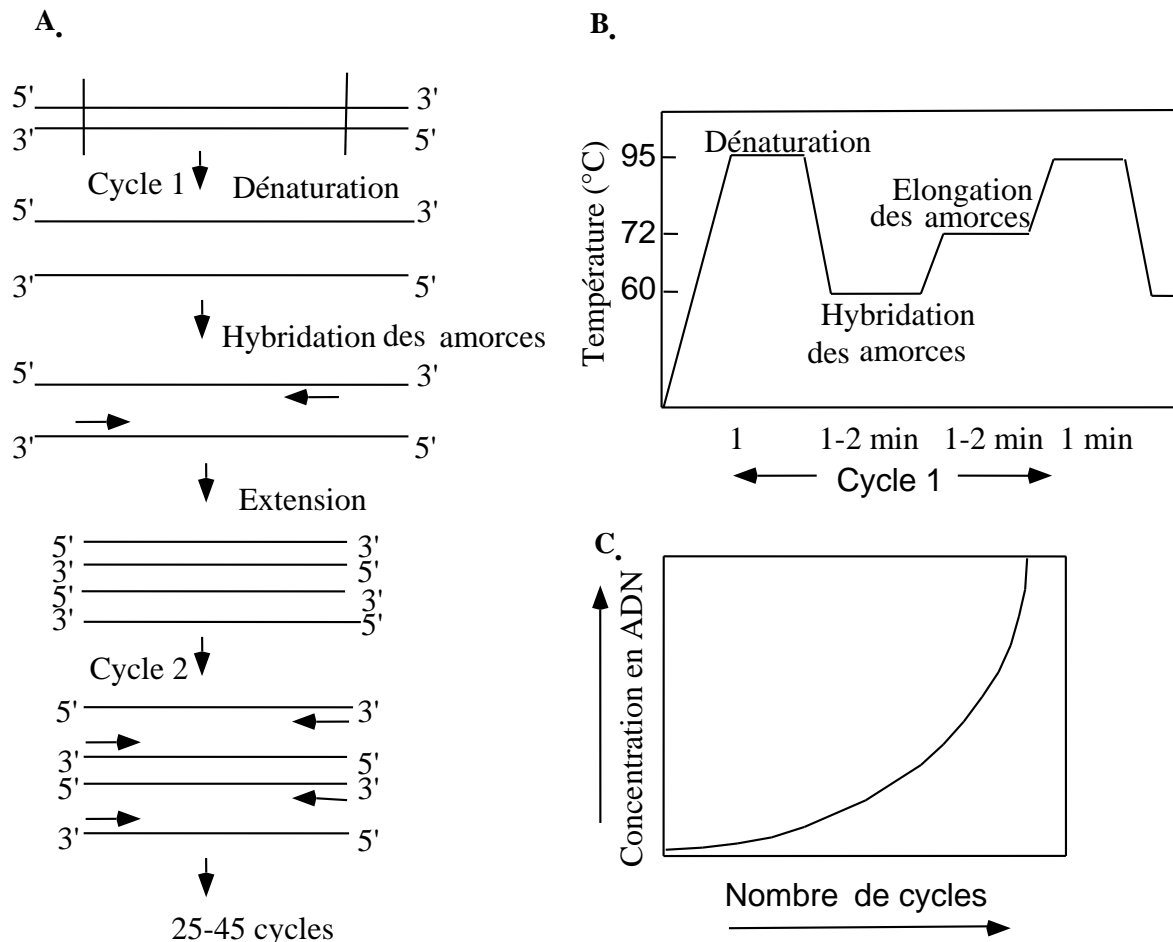


Figure 2.1

Principe de la PCR

(A) Diagramme schématique de l'amplification par PCR. Chaque cycle est décomposé en trois parties : la dénaturation de l'ADN matrice, l'hybridation des amorces et l'élongation des amorces. (B) Représentation graphique d'un cycle de PCR typique avec dénaturation pendant 1 min à 94°C, hybridation des amorces pendant 1 à 2 min à 60°C et élongation des amorces pendant 1 à 2 min à 72°C. (C) Quantification de l'ADN amplifié. La quantité des amplicons augmente de façon exponentielle au fur et à mesure que le nombre de cycles augmente.

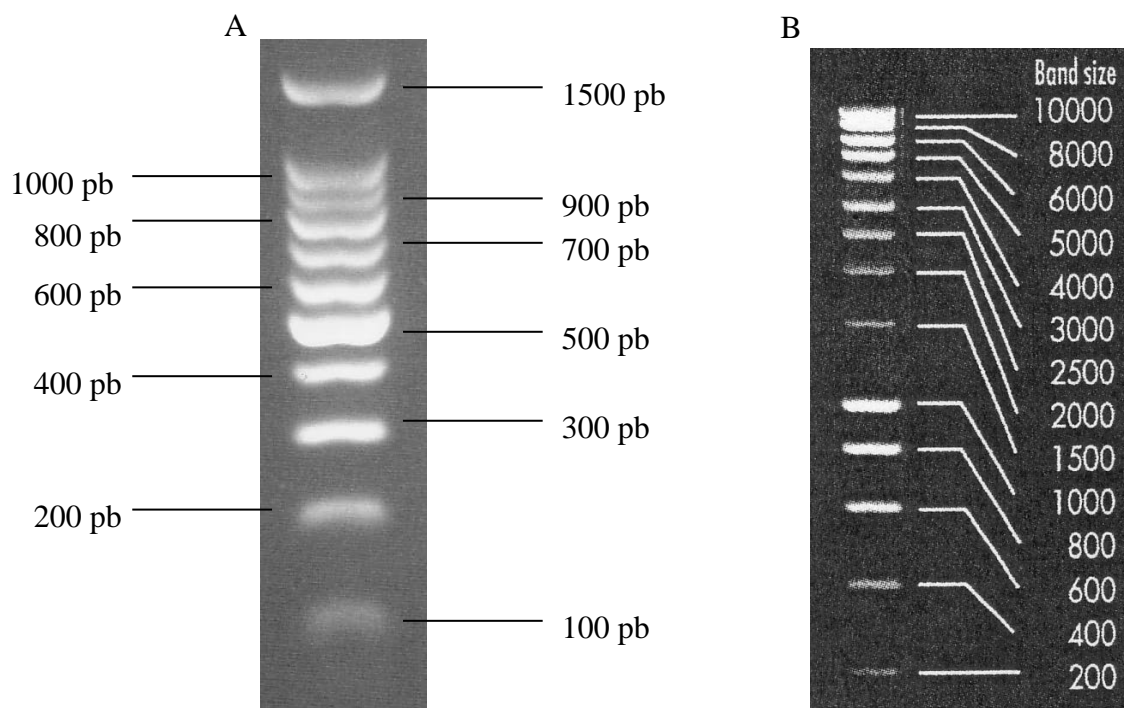


Figure 2.2

Marqueurs de poids moléculaire A : 100 bp DNA Ladder (Promega, USA) B : Smart Ladder (Eurogentec, Belgique).

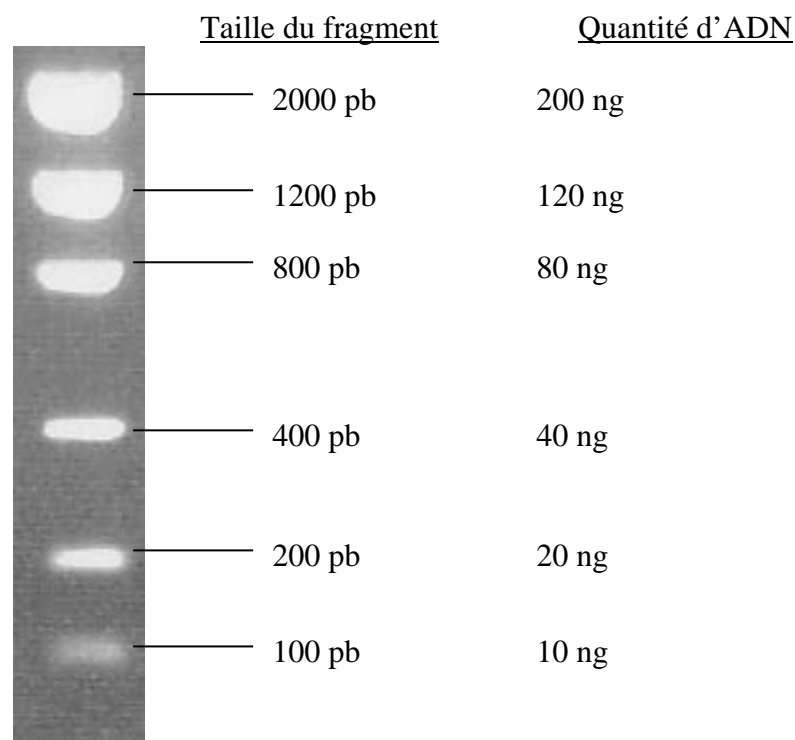


Figure 2.3

Marqueur de poids moléculaire Low DNA Mass Ladder (Invitrogen)
4 µl déposé sur gel d'agarose 2%

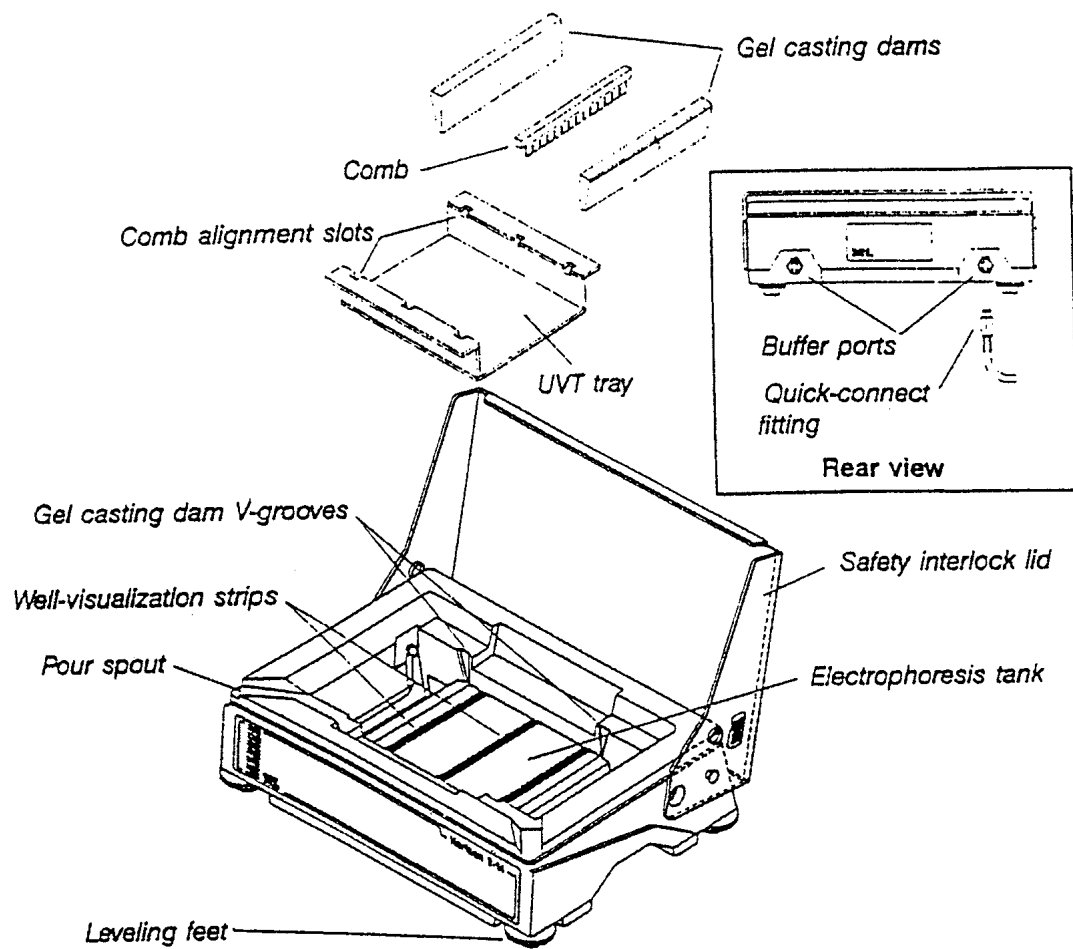


Figure 2.4
Cuve d'électrophorèse Horizon (Gibco Brl, USA)

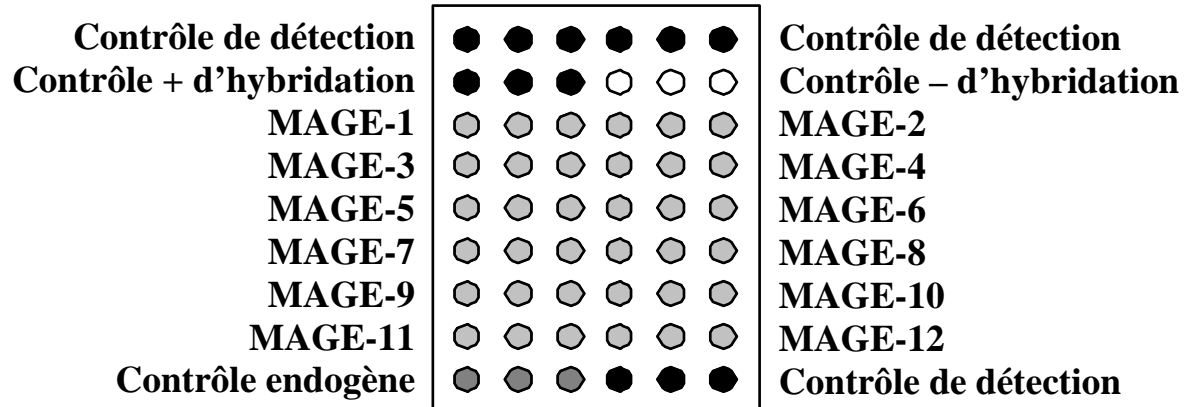


Figure 2.5

Design du microdamier *MAGE-A*

Chaque sonde capteur est présente en triplicats.

Le contrôle de détection et le contrôle positif d'hybridation sont représentés en noir. Pour chaque hybridation ces contrôles doivent donner un signal.

Le contrôle négatif d'hybridation apparaît en blanc. Pour chaque hybridation ce contrôle ne doit donner de signal.

Le contrôle endogène, séquence du gène ubiquiste *MAGE-D2*, est représenté en gris foncé.

Les sondes correspondant aux différents gènes *MAGE-A* sont représentées en gris clair.

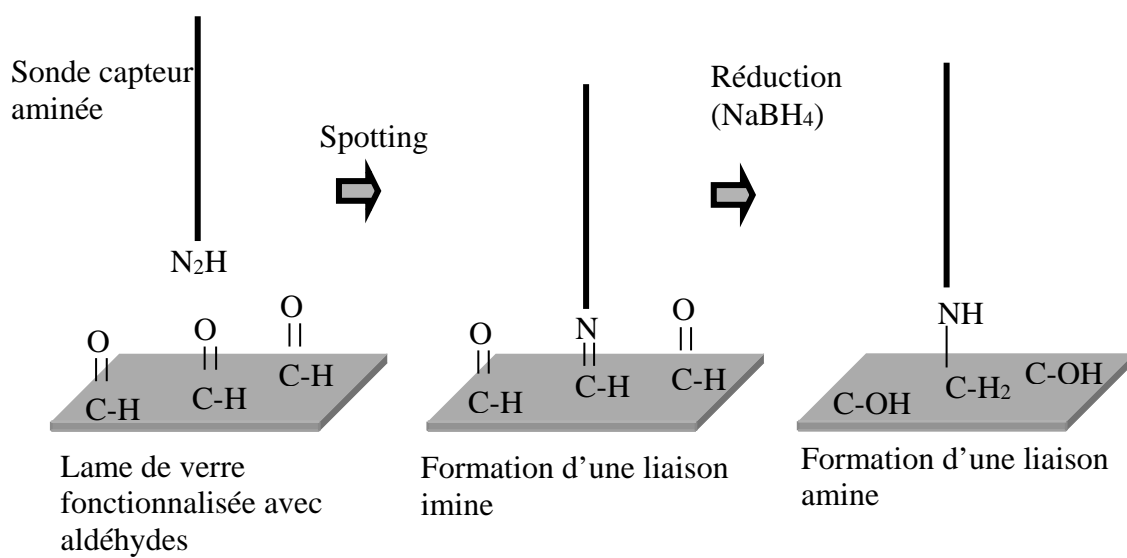


Figure 2.6

Lien covalent entre les sondes capteurs aminées et les lames de verre fonctionnalisées avec des aldéhydes (Diaglass, EAT, Belgique)

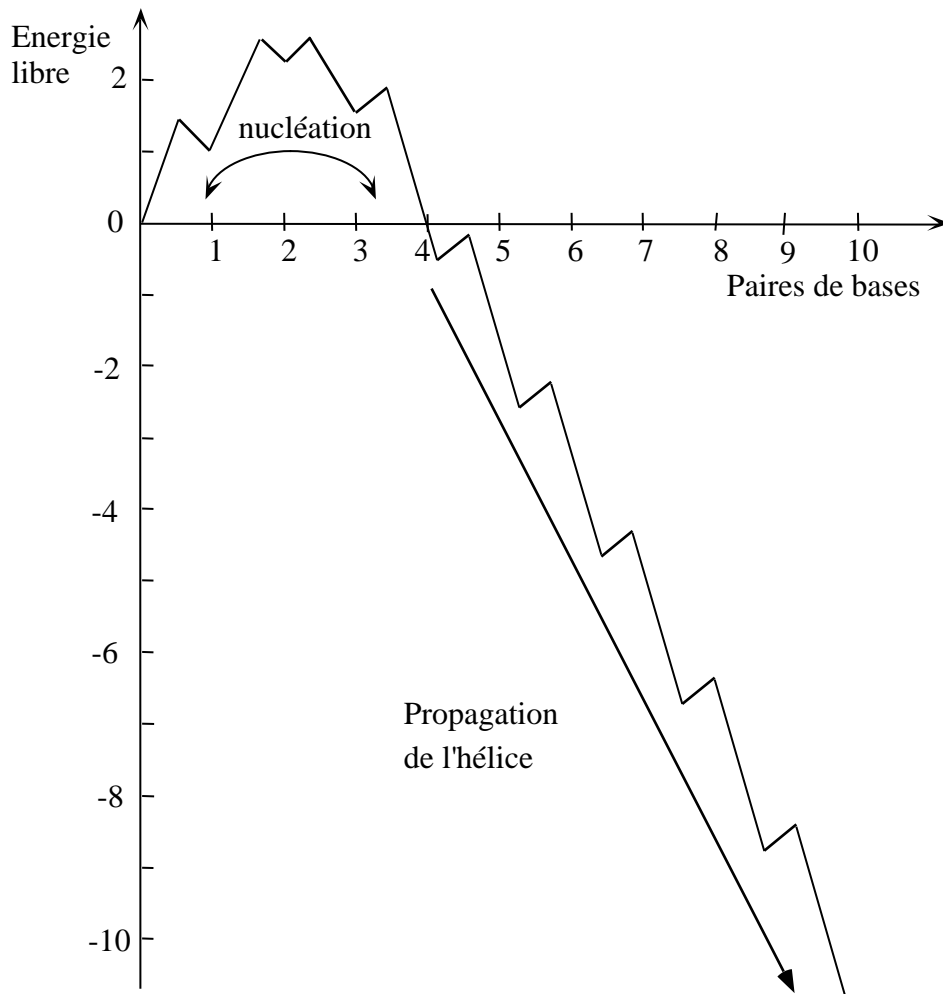


Figure 2.7

Profil énergétique de la réaction d'hybridation

Après avoir surmonté l'apport d'énergie libre nécessaire à l'étape de nucléation, l'énergie libre devient négative dans les étapes suivantes et l'hélice grandit spontanément. Le graphique représente l'énergie libre totale relative à la formation de l'hélice (exprimée en unités arbitraires) en fonction du nombre de paires de bases consécutives assemblées en hélice (d'après Porschke, 1977).

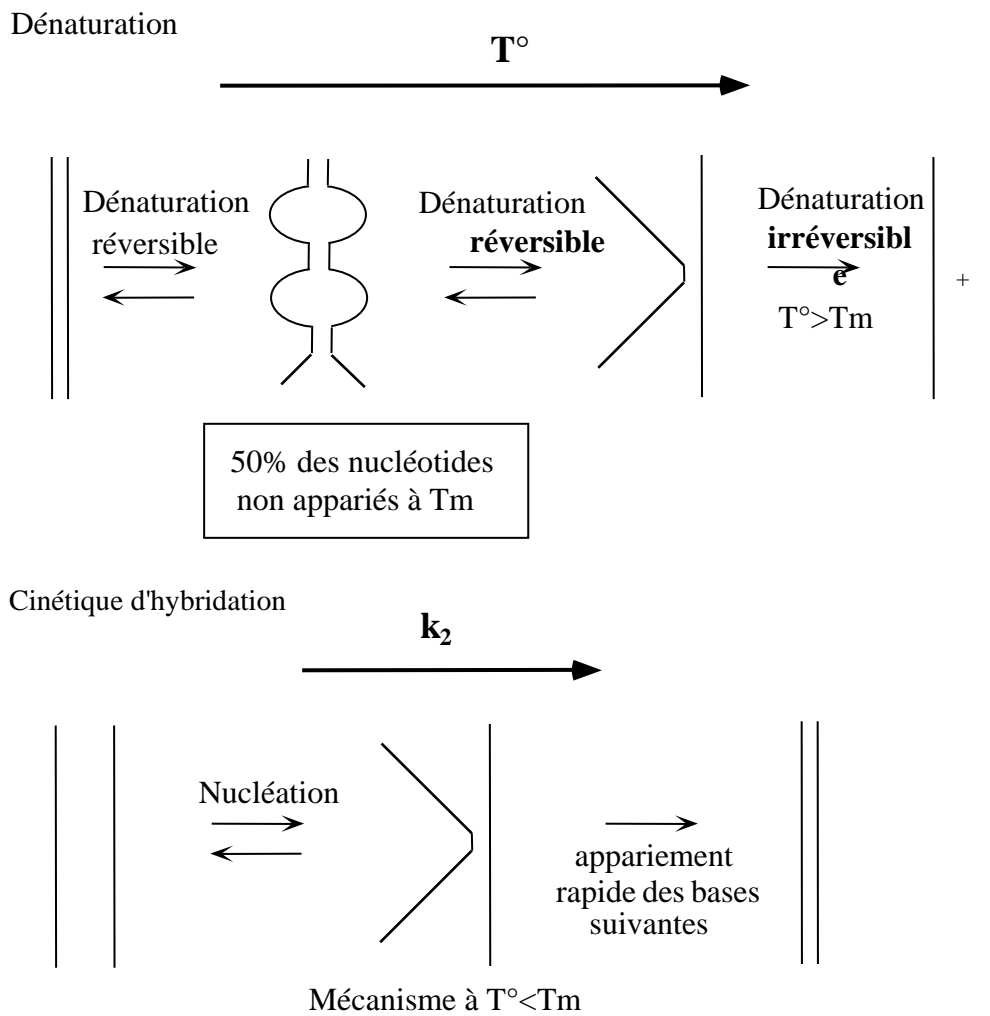


Figure 2.8

Thermodynamiques et cinétiques de la dénaturation et de l'hybridation des acides nucléiques
 (d'après Wetmur, 1991).

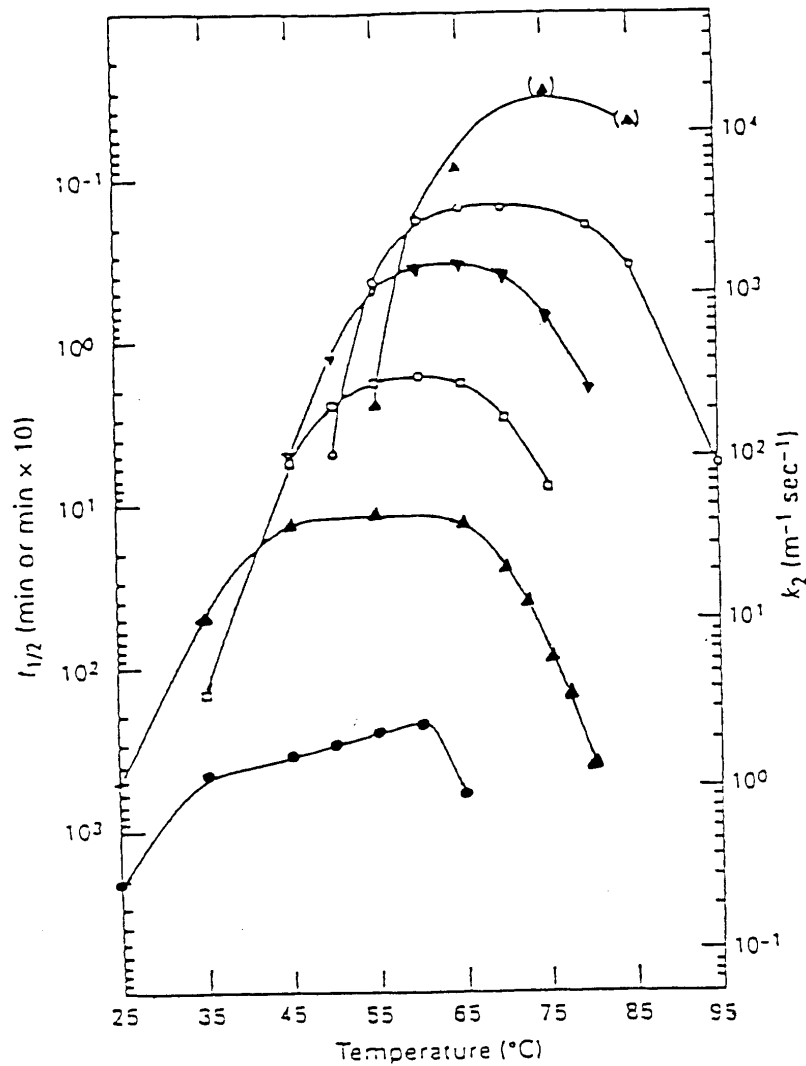


Figure 2.9

Effet de la force ionique et de la température sur la vitesse d'appariement de l'ADN

Le taux d'hybridation est fonction de la température à différentes forces ioniques. Le temps nécessaire pour que la moitié des molécules soient appariées, $t_{1/2}$, est donné en minutes sur l'ordonnée de gauche ; l'ordonnée de droite donne le taux constant de second ordre, $k_2 = 1/C_0 t_{1/2}$, où C_0 égale la moitié de la concentration molaire en ADN phosphate et $t_{1/2}$ est mesuré en secondes. La valeur de $t_{1/2}$ est notée en minutes pour les symboles ouverts et en minutes x 10 pour les symboles fermés. Symboles et T_m approximative pour chaque force ionique : 0.02, --●--, 75°C ; 0.05, --▲--, 81.5°C ; 0.1, --□--, 85.5°C ; 0.2, --▽--, 89.4°C ; 0.5, --○--, 94.2°C ; 1.0, --△--, T_m non mesurée. Les points entre parenthèses sont considérés comme moins fiables.

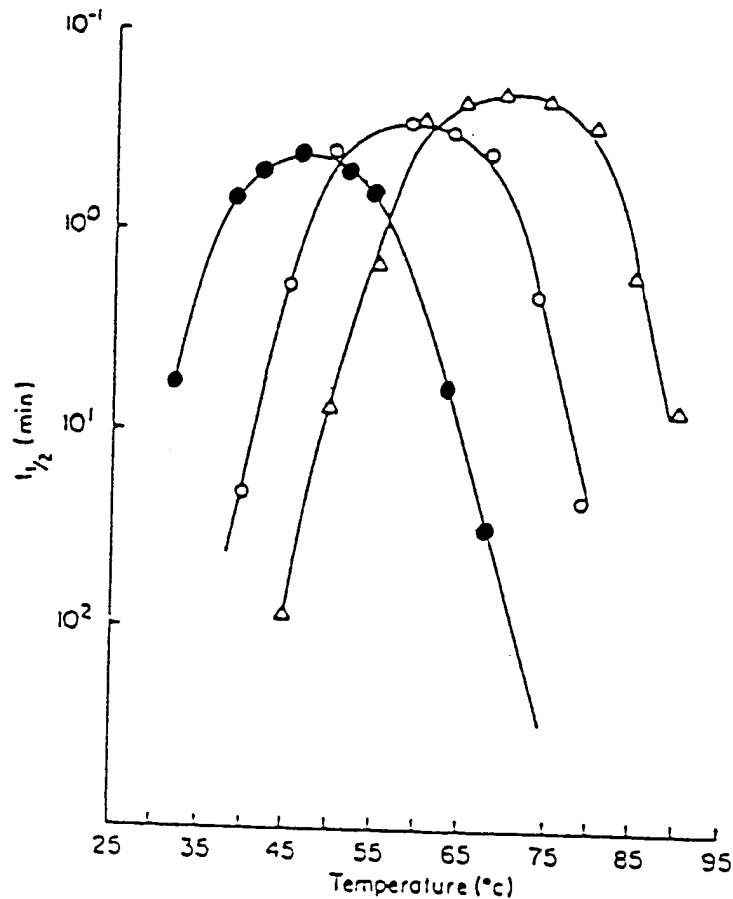


Figure 2.10

Choix de la température optimale d'hybridation lorsque des séquences cibles ayant différents degrés d'homologie sont présentes

Représentation schématique des courbes température-taux d'hybridation pour les hybrides formés entre les séquences cibles ayant 100% (--Δ--), 90% (--○--) et 80% (--●--) d'homologie avec la séquence sonde capteur. Le temps nécessaire pour que la moitié des molécules soient hybridées, $t_{1/2}$, est noté comme fonction de la température pour chaque hybride hypothétique. La T_m de la séquence parfaitement homologue est supposée être 95°C.

Les points donnés sont hypothétiques.

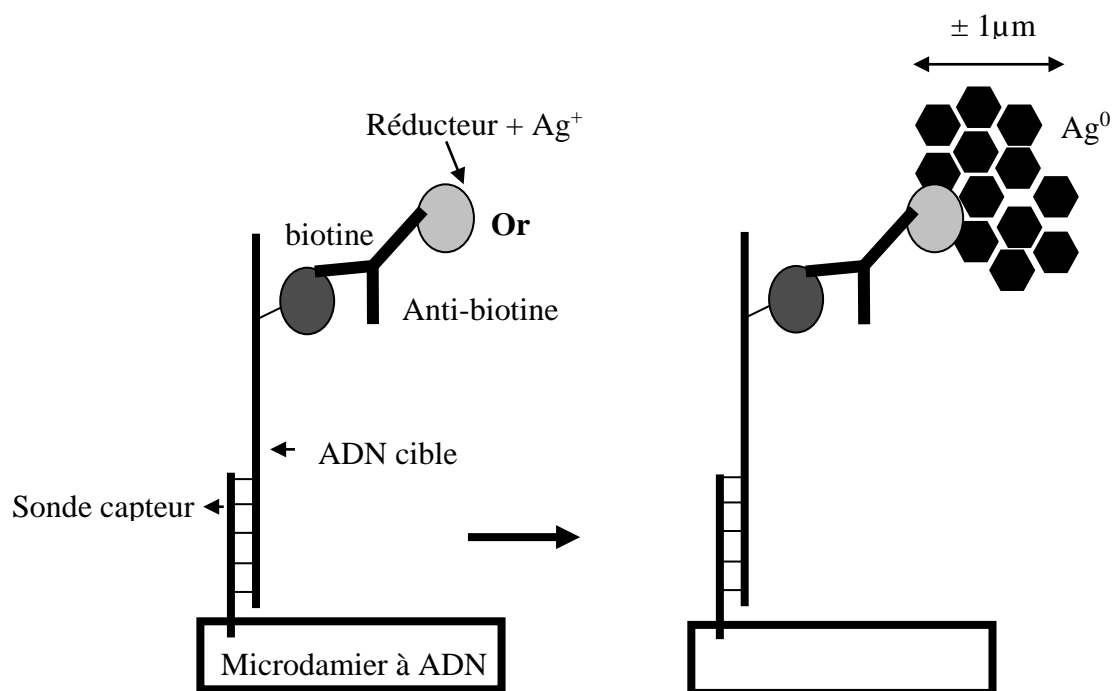


Figure 2.11

Détection colorimétrique de microdamier à ADN (d'après Alexandre et al., 2001).

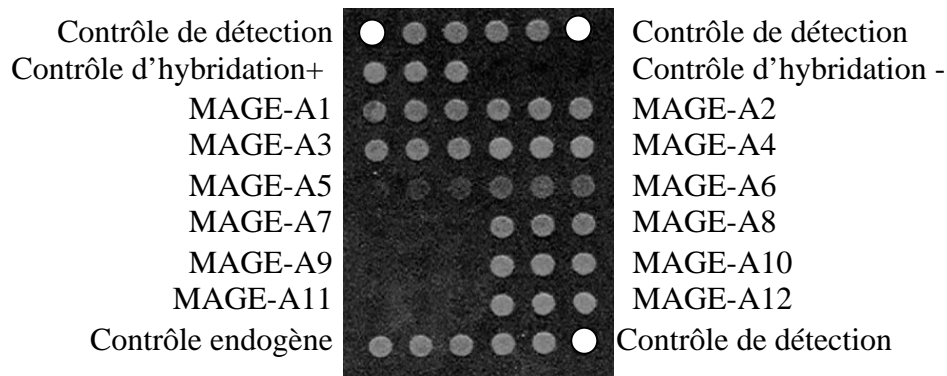


Figure 2.12

Exemple : image scannée du damier hybridé avec les amplicons d'un échantillon donné
Les trois spots représentés en blanc ont été utilisés comme spots de référence.

Mean intensities of the MageChips					
	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Mean	Deviation standard
Detection control	81,2	83,5	82,4	82,4	1,1
Detection control	82,8	82,7	79,9	81,8	1,7
Detection control	84,1	84,0	86,7	84,9	1,5
Hybridization control +	90,1	115,6	93,7	99,8	13,8
Hybridization control -	-4,0	-5,9	-6,6	-5,5	1,3
Endogen control	80,9	70,7	78,2	76,6	5,3
MAGE-A1	67,0	75,4	80,9	74,4	7,0
MAGE-A2	86,1	90,0	88,4	88,2	2,0
MAGE-A3	78,4	79,8	83,1	80,4	2,4
MAGE-A4	96,2	93,7	96,1	95,3	1,4
MAGE-A5	5,6	17,3	20,3	14,4	7,7
MAGE-A6	49,1	49,8	51,1	50,0	1,0
MAGE-A7	-8,2	-2,1	-2,4	-4,2	3,4
MAGE-A8	83,0	82,9	83,2	83,0	0,2
MAGE-A9	-5,5	-5,4	-5,1	-5,3	0,2
MAGE-A10	86,5	90,2	89,7	88,8	2,0
MAGE-A11	-9,2	-8,7	-5,9	-7,9	1,8
MAGE-A12	88,2	92,7	93,2	91,4	2,8

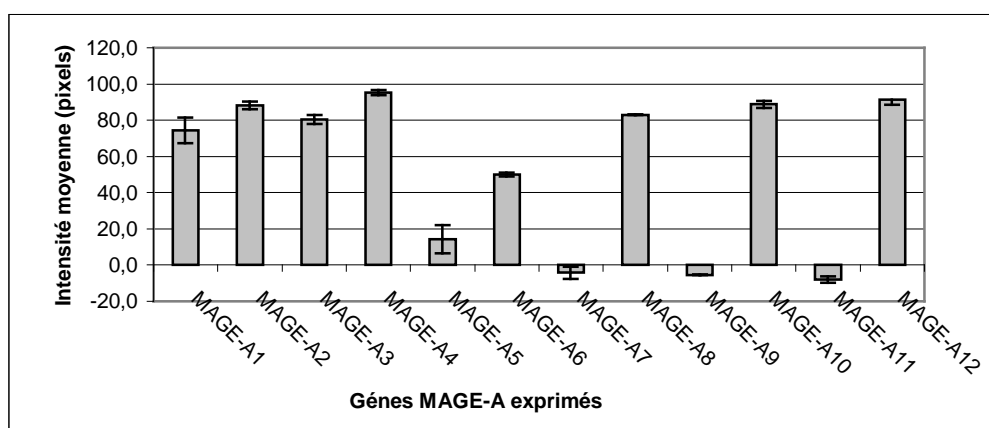
Figure 2.13

Exemple : tableau de quantification

Pour chacun des contrôles et des gènes *MAGE-A*, le programme calcule l'intensité des trois répliquats, calcule la moyenne de ces intensités et la déviation standard.

Figure 2.14

Exemple : Graphique des intensités des moyennes et écarts-types pour chaque gène *MAGE-A* exprimé dans un échantillon donné.



Detection table for the MageChips					
	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	+/-	
Detection control	+	+	+	3+ 0-	OK
Detection control	+	+	+	3+ 0-	
Detection control	+	+	+	3+ 0-	
Hybridization control +	+	+	+	3+ 0-	
Hybridization control -	-	-	-	0+ 3-	
Endogen control	+	+	+	3+ 0-	OK
MAGE-A1	+	+	+	3+ 0-	Detected
MAGE-A2	+	+	+	3+ 0-	Detected
MAGE-A3	+	+	+	3+ 0-	Detected
MAGE-A4	+	+	+	3+ 0-	Detected
MAGE-A5	+	+	+	3+ 0-	Detected
MAGE-A6	+	+	+	3+ 0-	Detected
MAGE-A7	-	-	-	0+ 3-	Undetected
MAGE-A8	+	+	+	3+ 0-	Detected
MAGE-A9	-	-	-	0+ 3-	Undetected

MAGE-A10	+	+	+	3+ 0-	Detected
MAGE-A11	-	-	-	0+ 3-	Undetected
MAGE-A12	+	+	+	3+ 0-	Detected

Figure 2.15

Exemple : tableau de détection

Pour chaque spot du damier, le programme donne une réponse de type oui ou non pour leur détection. Le symbole + correspond à un spot détecté, le symbole – à un spot non détecté. Les contrôles de détection, d'hybridation + et endogène doivent présenter trois spots + et le contrôle d'hybridation – trois spots – afin d'être acceptés. Un gène MAGE-A devra présenter deux ou trois spots + pour que son expression soit considérée comme détectée dans l'échantillon testé.

Tableau 2.1
Amorces utilisées dans la PCR triplex

Amorces	Séquences des amorces (5' → 3')	Longueur (nt)	Tm (°C)	Localisation ^a
Consensus sens <i>MAGE-A</i> DPSCONS2	GGGCTCCAGCAGCCAAGAAGAGGA	24	78	234-321 ^b
Sens spécifique <i>MAGE-A1</i> DPSMAGE1	GGGTTCCAGCAGCCGTGAAGAGGA	24	78	234
Sens spécifique <i>MAGE-A8</i> DPSMAG8	GGGTTCCAGCAGCAATGAAGAGGA	24	74	255
Sens spécifique <i>MAGE-A11</i> DPSMAG11	GGGCTCTGGCAGCCAAGAAAAGGA	24	76	255
Sens spécifique <i>MAGE-A12</i> DPSMAG12	GGGCTCCAGCAACGAAGAACAGGA	24	76	255
Consensus antisens <i>MAGE-A</i> DPASCONB4	CGGTACTCCAGGTAGTTTTCCTGC	24	74	732-838
Sens spécifique <i>MAGE-A3</i> DPSA3	AGTGATCCTGCATGTTATGAA	21	58	789
Antisens spécifique <i>MAGE-A3</i> DPASA3	GAATGGATTTCCTCAATTTGAG	21	58	1264
Sens spécifique <i>MAGE-D2</i> DPSD2	AGCTGAAGCCAAGGCTAGG	19	60	1469
Antisens spécifique <i>MAGE-D2</i> DPASD2	TGGCTGCCTAGAGTGCTGT	19	60	1892

^a La localisation des amorces indique la position en 5' de l'amorce sens (début) et la position en 3' de l'amorce antisens (fin)

Pour la localisation des amorces, la numérotation des nucléotides est relative au codon ATG de chaque gène *MAGE*.

^b La localisation des amorces consensus variant d'un gène *MAGE-A* à l'autre, la position de l'amorce comporte deux nombres traduisant l'étendue de l'appariement pour les 12 gènes *MAGE-A*

Tableau 2.2

Sondes capteurs utilisées pour identifier les produits de la PCR triplex

Sondes	Séquences des sondes (5' → 3')	Longueur (nt)	T _m ^a (°C)	Localisation ^b
<i>MAGE-A1</i>	GCACCTCTTGTATCCTGGAGTCCTTGT	27	74	266-292
<i>MAGE-A2</i>	GAATGTTTCCCGACCTGGAGTCCGAGT	27	79	287-313
<i>MAGE-A3</i>	TCAAAACCCACTCATGCAGGGGTGG	25	79	904-928
<i>MAGE-A4</i>	TCGCCTGACGCAGAGTCCTTGTTCGA	27	84	395-321
<i>MAGE-A5</i>	CCCTGACCCAGAGTCTGTGTTCCGAGC	27	80	394-320
<i>MAGE-A6</i>	CAAGACAGGCTTCCTGATAATCATCCT	27	72	591-617
<i>MAGE-A7</i>	AGACACACCCCGCTCACCTGGCGTCCT	27	85	291-317
<i>MAGE-A8</i>	CCCCGGACCCAGCTCACCTGGAGTCCC	27	87	293-319
<i>MAGE-A9</i>	CGGTCGACCCAGCTCAGCTGGAGTTCA	27	83	281-307
<i>MAGE-A10</i>	TCCTGCCAGACAGTGAGTCTTTACCCA	27	76	365-391
<i>MAGE-A11</i>	TGACCTGATAGACCCTGAGTCCTTTTC	27	72	297-323
<i>MAGE-A12</i>	ACCTGGAGACGAGCTTCCAAGTAGCAC	27	76	299-325
<i>MAGE-D2</i>	ACTGTTATTGGTACTGGTACTGGCACC	27	71	1647-1673

^a La T_m est calculée à l'aide du programme Oligo-4 (National Biosciences, Inc) suivant la méthode du plus proche voisin.

^b Pour la localisation des sondes, la numérotation des nucléotides est relative au codon ATG de chaque gène *MAGE*.

3. Résultats et discussions

3.1 Description des conditions initiales

L'objectif de ce mémoire consiste en l'optimisation de la discrimination des différents gènes *MAGE-A*, exprimés dans des lignées cellulaires ou des tissus tumoraux, sur microdamier à ADN. Cette discrimination est réalisée suite à une amplification de l'ADNc des différents gènes par la stratégie de PCR triplex. Les paramètres suivants ont été mis au point préalablement à ce travail.

3.1.1 PCR triplex

La PCR triplex comprend trois paires d'amorces servant à l'amplification des douze gènes *MAGE-A* et du contrôle endogène *MAGE-D2*, les séquences des amorces sont reprises dans le tableau 2.1 dans la partie matériel et méthode et leur localisation est présentée à la figure 1.8.

La première paire d'amorces est une paire d'amorces consensus permettant l'amplification des douze gènes *MAGE-A*. Suite à l'alignement des séquences de ces différents gènes, les séquences de ces amorces ont été choisies dans deux régions très conservées du dernier exon. Il n'a pas été possible de définir ces amorces dans des exons différents car il n'existe pas d'homologie de séquence suffisante entre les gènes *MAGE-A* dans les autres exons. La taille des amplicons obtenus est d'environ 540 pb. Les séquences des gènes *MAGE-A1*, *A8* et *A12* comportant trois mésappariements par rapport à l'amorce consensus sens, l'efficacité de leur amplification n'était pas assez élevée. Pour y remédier, des amorces sens spécifiques ont été ajoutées pour ces gènes, à la même position que l'amorce consensus sens.

La deuxième paire d'amorces est spécifique de la séquence du gène *MAGE-A3*. Ces amorces sont situées dans le dernier exon du gène, en aval de la séquence amplifiée par les amorces consensus. Lors de l'essai de la première stratégie de discrimination sur microdamier à ADN, les amplicons *MAGE-A6* s'hybridaient sur la sonde capteur *MAGE-A3*, donnant lieu à un faux positif. Il est en effet difficile de pouvoir différencier ces deux gènes qui partagent une identité de séquence de 98%. La présence de cette paire d'amorces va permettre la discrimination du gène *MAGE-A3* et du gène *MAGE-A6* sur base de la PCR. En effet, chaque amorce spécifique de *MAGE-A3* présente deux mésappariements par rapport à la séquence du gène *MAGE-A6* dont une très discriminante à l'extrémité 3'. La taille du produit PCR obtenu est de 496 pb.

La troisième paire d'amorces contribue à l'amplification d'une partie de la séquence du gène ubiquiste *MAGE-D2*. Ce gène est utilisé comme contrôle endogène, il doit être détecté lors de chaque hybridation. Il permet de contrôler les étapes précédant l'hybridation. Les amorces sont définies dans les exons 12 et 13 du gène. Comme ces amorces sont situées dans des exons différents, il est possible de distinguer par électrophorèse les produits issus d'une amplification d'ADNc (650 pb) des ceux provenant d'ADNg (450 pb).

La température d'hybridation des amorces ou température d'annealing fut choisie à 65°C. Cette température se situant environ 10°C sous la T_m des amorces consensus (cf. tableau 2.1 dans la partie matériel et méthode), leur taux d'hybridation est assez élevé. Le but est de favoriser l'appariement des amorces afin d'amplifier tous les gènes *MAGE-A* avec une bonne efficacité. Cette température est également suffisamment élevée pour que les amorces spécifiques de *MAGE-A3* se fixent uniquement à l'ADNc de *MAGE-A3* et non celui de

MAGE-A6. En effet, la T_m des amorces de *MAGE-A3* étant de 60°C, une température d'hybridation de 65°C est très stricte et va favoriser uniquement l'appariement des amorces parfaitement complémentaires de leur séquence cible. La spécificité des amorces *MAGE-A3* et de celles *MAGE-D2* ont été testées dans des expériences préliminaires vis-à-vis de plasmides recombinants contenant l'ADNc des différents gènes *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A5*, *A6*, *A8*, *A9*, *A10*, *A11*, *A12* et *D2*. Seul le plasmide contenant l'ADNc de *MAGE-A3* et celui contenant l'ADNc de *MAGE-D2* ont été respectivement amplifiés par leurs amorces spécifiques (résultats non montrés). Le rapport des trois couples d'amorces a aussi été déterminé : 0,25 μ M pour l'amorce consensus sens et les amorces spécifiques sens, 1 μ M pour l'amorce consensus antisens et les amorces *MAGE-A3* spécifiques et 0,5 μ M pour les amorces *MAGE-D2* spécifiques. Le reste des conditions d'amplification sont reprises de l'article Zammattéo et al., 2002. La PCR est effectuée en présence de nucléotides biotinylés afin de permettre la détection des amplicons sur microdamier.

3.1.2 Fabrication microdamier à ADN

Le microdamier utilisé dans ce travail avait également été conçu antérieurement. Il comprend les sondes capteurs des différents gènes *MAGE-A* ainsi que divers contrôles permettant de suivre le bon déroulement du test (contrôles de détection, contrôles positifs et négatifs d'hybridation, contrôle endogène *MAGE-D2*). Chaque sonde capteur est déposée en triplicats sur la lame de verre. Les sondes capteurs ont toutes la même taille, rendant ainsi leur accessibilité équivalente pour tous les amplicons. Elles ont également été sélectionnées de manière à avoir le plus grand nombre de mésappariements possibles entre leur séquence et celles des autres *MAGE-A* afin de diminuer le risque d'hybridation croisée. Les sondes sont fixées au support par leur extrémité, ce qui permet un bon contrôle de la séquence accessible à l'hybridation. Les séquences des différentes sondes capteurs sont reprises dans le tableau 2.2 dans la partie matériel et méthode. La sonde capteur de *MAGE-A3* est complémentaire de la séquence amplifiée par les amorces spécifiques de ce gène.

3.2 Optimisation des conditions d'hybridation et de détection en colorimétrie

La réaction d'hybridation entre la séquence d'ADN cible amplifiée par PCR et la sonde capteur qui lui est complémentaire dépend de plusieurs paramètres : la température, la force ionique, la concentration en sondes capteurs, la quantité d'ADN cible, le nombre de mésappariements entre les séquences. La difficulté de mise au point de l'hybridation d'amplicons *MAGE-A* sur microdamier vient du haut pourcentage d'identité existant entre les différentes séquences (tableau 3.1). L'amplicon et la sonde capteur *MAGE-A3* ne sont pas repris dans ce tableau car la discrimination de ce gène se fait sur base de la PCR et non de l'hybridation sur microdamier. Afin d'éviter les hybridations croisées, les paramètres de l'hybridation doivent être optimisés ainsi que les lavages effectués par la suite, ayant pour but d'éliminer toutes les molécules liées de façon non spécifique.

Les hybrides formés sont mis en évidence par l'utilisation d'anticorps anti-biotine marqué à l'or colloïdal. L'anticorps se fixe sur les biotines incorporées dans les amplicons cibles et l'or permet la détection colorimétrique du complexe formé. Différents paramètres de cette détection contribuent également à la spécificité et à la sensibilité du test : la dilution du conjugué, l'agent bloquant utilisé lors de son incubation ainsi que les lavages qui suivent son incubation.

Certains paramètres ont été déterminés avant le début de ce travail.

La température à laquelle est effectuée la réaction d'hybridation fut optimisée à 65°C. Cette température est inférieure aux T_m des différentes sondes capteurs, ce qui assure un taux d'hybridation élevé. Cette température doit cependant être suffisamment élevée pour permettre l'hybridation spécifique des différentes séquences malgré leur forte identité.

La durée de l'hybridation a été fixée à 30 minutes. Ce temps est suffisant pour obtenir un rendement maximum de l'hybridation ADN cible/sonde capteur. Des temps d'incubation plus longs ne contribuent pas à augmenter les signaux d'hybridation. Cela peut s'expliquer par la réaction compétitive de réassociation en solution des amplicons au détriment des hybrides sondes capteurs/ADN cible.

Le volume d'amplicons utilisés pour l'hybridation a été fixé à 20 μ l afin d'obtenir les meilleurs signaux.

L'agent dénaturant permettant la séparation des brins des amplicons avant l'hybridation a également été défini. Du NaOH 0,175 N est utilisé, il est incubé 5 minutes avec les amplicons. Les molécules simple brin obtenues seront alors disponibles pour l'hybridation.

Enfin, le tampon utilisé lors de la réaction d'hybridation et qui neutralise l'action du NaOH a été choisi auparavant, il s'agit de tampon phosphate à une concentration de 0,6 M à un pH 7,4.

La première étape de ce travail a consisté en l'optimisation des conditions d'hybridation et de détection colorimétrique afin d'éviter les hybridations croisées. Toutes les expériences qui suivent sont réalisées en double, les images scannées sont présentées en simple afin de ne pas charger la présentation.

3.2.1 Conditions expérimentales

Afin de déterminer les conditions optimales de spécificité du test, nous avons utilisé des plasmides recombinants comportant l'ADNc des différents gènes *MAGE-A* et *D2*. *MAGE-A7* étant un pseudogène, nous ne disposons pas de plasmide correspondant à ce gène. La concentration des amplicons obtenus pour les différents plasmides a été évaluée par PCR semi-quantitative pour hybrider la même quantité d'amplicons sur microdamier pour chaque plasmide. Ces différents ADN ont été amplifiés selon les conditions initiales de PCR triplex puis hybridé sur microdamier. Avant chaque hybridation une fraction des produits PCR est déposée sur gel d'agarose en parallèle d'un marqueur d'un marqueur de poids moléculaire et subit une électrophorèse de 45 minutes à 100 volts. La taille des amplicons est ainsi vérifiée. Les témoins négatifs des pièces PCR 1 et 2 sont également déposés sur gel afin de détecter d'éventuelles contaminations. Les différents paramètres qui furent testés sont repris dans le tableau 3.2.

3.2.2 Résultats

Les amplicons présentant le plus grand nombre d'hybridations croisées furent utilisés pour déterminer les conditions d'hybridation et de détection colorimétrique. Ces conditions sont reprises dans le tableau 3.3. La stringence des lavages fut le paramètre dont l'effet a été le plus marqué. Ces lavages doivent être hautement stringents afin de permettre l'hybridation

de séquences parfaitement complémentaires. La figure 3.1 montre que l'application de lavages stringents consécutifs à l'incubation du conjugué permet d'éliminer les hybridations croisées sur les sondes *MAGE-A1*, *A2*, *A5*, *A6* et *A7* existant lors de l'hybridation d'amplicons *MAGE-A4*.

Les amplicons correspondant aux différents gènes *MAGE-A* et *D2* furent testés dans les conditions d'hybridation optimales (figure 3.2). Un signal unique est détecté sur la sonde capteur correspondant à chacun des gènes. La discrimination entre les gènes *MAGE-A3* et *MAGE-A6* parfaite contrairement à la première stratégie mise en place. Le microdamier permet une discrimination de séquences présentant un pourcentage d'identité aussi élevé que 92% (tableau 3.1). La spécificité vis-à-vis de la sonde capteur *MAGE-A7* n'a pas pu être évaluée du fait qu'il n'est pas possible d'obtenir de l'ADNc pour ce pseudogène. Cependant comme cette sonde présente une faible identité par rapport aux autres gènes *MAGE-A* (30 à 70%), il est peu probable d'observer des signaux faux positifs sur celle-ci dans les conditions optimales d'hybridation.

La spécificité du test fut également évaluée au départ d'ARN total de lignées cellulaires tumorales de référence LB905-BLC, LB1751-MEL et LB373-MEL. L'ADNc est rétrotranscrit à partir de 2 µg d'ARN total extrait et 1/40 du volume de rétrotranscription est utilisé lors de la PCR. Ces trois lignées ont été choisies car leur combinaison couvrent l'ensemble des gènes *MAGE-A* pouvant être exprimés dans les tumeurs. Le pattern d'expression de ces lignées a été déterminé par la méthode de référence utilisée à l'Institut Ludwig (tableau 3.4). LB905-BLC exprime *MAGE-A1* et *A9* ; LB1751-MEL exprime fortement *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A6*, *A8*, *A10*, faiblement *A5*, *A11* et *A12* ; LB373-MEL exprime fortement *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A6*, *A10*, *A11*, *A12* faiblement *A5* et *A9*. *MAGE-D2* étant constitutif, est exprimé dans toutes les lignées cellulaires.

Le profil électrophorétique de ces trois lignées présenté à la figure 3.3 montre que les produits PCR présentent la taille attendue, 540 pb pour les gènes *MAGE-A* et 450 pb pour le gène *MAGE-D2*. Notons également que l'intensité de la bande correspondant aux gènes *MAGE-A* semble corrélée au nombre de ces gènes exprimés dans les différentes lignées cellulaires. Une intensité de bande plus faible est observée pour la lignée LB905-BLC n'exprimant que deux gènes par rapport à celle observée pour les lignées LB1751-MEL et LB373-MEL en exprimant 10. La bande correspondant au gène *MAGE-D2* est d'intensité comparable à celle obtenue pour la lignée LB905-BLC exprimant peu de gènes *MAGE-A*. Cela indique que le taux d'amplification du gène *MAGE-D2* et celui des différents gènes *MAGE-A* est de même ordre.

Les résultats de l'hybridation présentés à la figure 3.4 indique une bonne spécificité du test dans les conditions d'hybridation choisies. Les contrôles de détection, d'hybridation positif et négatif ainsi que le contrôle endogène sont corrects. Les contrôles de détection, d'hybridation positif et endogène doivent toujours être détectés, le contrôle d'hybridation négatif ne doit jamais être détecté. Ces contrôles reflètent le bon déroulement des différentes étapes du test. Cependant certains gènes ne sont pas détectés sur le microdamier bien qu'ils soient exprimés dans la lignée cellulaire. Le gène *MAGE-A3* n'est pas détecté dans la lignée LB1751-MEL et le gène *MAGE-A11* n'est pas détecté dans la lignée LB373-MEL. Le gène *MAGE-A5*, faiblement exprimé dans les lignées LB1751-MEL et LB373-MEL, n'est pas détecté ici. Notons également que des signaux très faibles sont observés pour les gènes *MAGE-A1* et *MAGE-A6* dans la lignée LB1751-MEL. La sensibilité du test doit donc être augmentée. Pour se faire, nous allons faire varier un certain nombre de paramètres de la PCR

et évaluer leur influence. Nous allons tout d'abord augmenter le nombre de cycles PCR afin d'accroître la concentration des amplicons qui seront hybridés sur microdamier. Pour détecter le gène *MAGE-A3*, nous testerons des concentrations en amorces spécifiques plus élevées. Enfin, nous allons comparer deux types de marquages des amplicons à la biotine et déterminer celui qui permet la meilleure incorporation du marqueur.

3.3 Optimisation du nombre de cycles PCR

Dans l'expérience précédente, nous avons mis en évidence le manque de sensibilité du test. Les amplicons avaient été amplifiés par 30 cycles de PCR. Ici nous avons testé en parallèle 30, 33 et 35 cycles de PCR.

3.3.1 Conditions expérimentales

L'ADNc amplifié provient de la lignée cellulaire tumorale de référence LB1751-MEL pour laquelle le gène *MAGE-A3* est exprimé mais n'a pas été détecté. L'ADNc est amplifié dans les conditions définies pour la PCR triplex. Le nombre de cycles testé est : 30, 33 et 35 cycles. Un cycle comprend 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 65°C et 30 secondes à 72°C. L'hybridation des amplicons sur microdamier est réalisée dans les conditions optimales.

3.3.2 Résultats

Avant de réaliser l'hybridation sur microdamier, la taille des produits PCR obtenus et l'absence de contaminations ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (donnée non montrée). Cette vérification sera effectuée à chaque expérience.

Les résultats de l'hybridation sont présentés à la figure 3.5. Le pattern d'expression attendu est *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A6*, *A8*, *A10*, faiblement *A5*, *A11* et *A12* et *MAGE-D2*. Les différents contrôles sont corrects. Après 30 cycles de PCR, le gène *MAGE-A3* n'est pas détecté. Après 33 cycles de PCR, un faible signal est observé sur la sonde *MAGE-A3*. Après 35 cycles de PCR, un signal bien visible est obtenu au niveau de la sonde *MAGE-A3*.

La quantification des signaux a été obtenue par le programme Imachips comme décrit au point 2.7 dans la partie matériel et méthode. Les intensités moyennes obtenues pour chaque gène *MAGE-A* en fonction du nombre de cycles PCR effectué sont portées en graphique (figure 3.6). Globalement une augmentation de l'intensité moyenne des signaux est observée pour la plupart des gènes *MAGE-A* exprimés en fonction du nombre de cycles PCR effectués. Cette augmentation est peu marquée pour le gène *MAGE-A4*, pour lequel l'intensité moyenne des signaux après 30 cycles PCR est déjà élevée. Pour le gène *MAGE-A6*, l'intensité moyenne des signaux reste faible malgré l'augmentation du nombre de cycles PCR. Pour le gène *MAGE-A3* et *MAGE-A1*, une forte augmentation de l'intensité moyenne du signal est observée après 35 cycles de PCR. Cette condition sera donc gardée pour la suite des mises au point.

3.4 Optimisation de la concentration en amorces dans la PCR triplex

Un autre paramètre a été modifié afin d'augmenter l'intensité du signal obtenu pour le gène *MAGE-A3*. Différentes concentrations en amorces spécifiques de *MAGE-A3* ont été

testés afin de déterminer laquelle offre la meilleure intensité de signal pour *MAGE-A3* sans diminuer l'efficacité de la PCR pour les autres couples d'amorces.

3.4.1 Conditions expérimentales

L'ADNc de la lignée cellulaire tumorale de référence LB1751-MEL est amplifié durant 35 cycles de PCR en présence de trois concentrations en amorces spécifiques *MAGE-A3* différentes : 1 μ M, 2 μ M et 4 μ M. La concentration des autres amorces reste la même que précédemment.

3.4.2 Résultats

Les résultats d'hybridations sont représentés à la figure 3.7. Tous les contrôles sont corrects et le pattern d'expression détecté sur le microdamier correspond aux gènes exprimés dans la lignée cellulaire tumorale LB1751-MEL. Pour les amplicons obtenus en présence d'une concentration d'amorces spécifiques de 1 μ M, le signal obtenu sur la sonde *MAGE-A3* est faible. En augmentant la concentration en amorces spécifiques *MAGE-A3* à 2 μ M et 4 μ M, le signal est plus élevé sur la sonde *MAGE-A3* sans pour autant diminuer les signaux obtenus pour les autres gènes.

L'intensité moyenne des signaux obtenus pour les amplicons hybridés a été quantifiée par le programme Imachips. Les résultats ont été portés en graphique (figure 3.8). Pour chaque gène *MAGE-A*, l'intensité moyenne du signal est observée en fonction de la concentration en amorces *MAGE-A3*. Pour le gène *MAGE-A3*, une forte augmentation du signal apparaît en fonction de l'augmentation de la concentration en amorces spécifiques. En multipliant la concentration en amorces *MAGE-A3* par 4 dans la PCR, l'intensité moyenne du signal pour *MAGE-A3* double. L'intensité moyenne d'autres gènes *MAGE-A* augmente légèrement lors de l'utilisation de plus hautes concentrations en amorces spécifiques *MAGE-A3*, c'est le cas pour le gène *MAGE-A5* faiblement exprimé dans la lignée LB1751-MEL qui n'est pas détecté pour une concentration de 1 μ M en amorces *MAGE-A3* et qui devient visible pour les concentrations de 2 μ M et 4 μ M (figure 3.7).

La concentration de 4 μ M en amorces spécifiques *MAGE-A3* sera utilisée pour la suite des mises au point. Nous avons vérifié que l'ADNc *MAGE-A6* n'était pas amplifié dans ces nouvelles conditions (données non montrées).

3.5 Application des conditions actuelles à des lignées cellulaires tumorales de référence

L'optimisation des conditions de cycle de PCR ainsi que la concentration en amorces *MAGE-A3* a permis d'améliorer la sensibilité du test. Les conditions actuelles ont été appliquées à quatre lignées cellulaires tumorales de référence incluant LB1751-MEL, testée dans l'expérience précédente.

3.5.1 Conditions expérimentales

L'expérience a été réalisée sur les trois lignées cellulaires tumorales de référence testées précédemment (figure 3.4) : LB1751-MEL, LB373-MEL, LB905-BLC ainsi que sur la lignée MZ2-MEL exprimant fortement les gènes *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A6* et *A10*, faiblement *A5* et

A12. L'ADNc de ces lignées est amplifié par 35 cycles de PCR en présence d'une concentration en amorces spécifiques *MAGE-A3* de 4 μ M. L'hybridation des amplicons sur microdamier est réalisée dans les conditions optimales.

3.5.2 Résultats

Les résultats d'hybridations sont représentés à la figure 3.9. Tous les contrôles sont corrects. Le pattern d'expression détecté sur les microdamiers correspond bien aux gènes *MAGE-A* exprimés dans les lignées cellulaires de référence, à l'exception du gène *MAGE-A11* qui est fortement exprimé dans la lignée cellulaire tumorale LB373-MEL. L'amorce consensus sens présente trois mésappariements par rapport à la séquence de *MAGE-A11* dont une très discriminante à proximité de l'extrémité 3'. L'absence de signal pourrait s'expliquer par la difficulté de cette amorce à se fixer sur la séquence de l'ADNc de *MAGE-A11* tout comme cela avait été observé pour les séquences des gènes *MAGE-A1*, *A8* et *A12* présentant les mêmes caractéristiques (cf. la figure 1.7 dans la partie introduction). L'ajout d'amorces spécifiques correspondant à ces trois gènes avait solutionné le problème (Zammatteo et al., 2002b). Nous testerons donc par la suite l'ajout d'une amorce sens spécifique *MAGE-A11* afin de voir s'il est ainsi possible de l'amplifier et de le détecter. La détection de *MAGE-A3* est effective pour toutes les lignées exprimant ce gène. Les conditions de PCR et d'hybridation utilisées ici seront maintenues pour les manipulations suivantes.

3.6 Ajout d'une amorce sens spécifique *MAGE-A11*

Les résultats obtenus sur microdamier dans l'expérience précédente montrent que le gène *MAGE-A11* n'est pas détecté dans la lignée cellulaire LB373-MEL. Nous allons tester si l'ajout d'une amorce sens spécifique *MAGE-A11* (la séquence est reprise dans le tableau 2.1 dans la partie matériel et méthode) dans la PCR triplex permet de mettre en évidence ce gène.

3.6.1 Conditions expérimentales

Dans le mélange PCR, on ajoute l'amorce spécifique sens *MAGE-A11* à une concentration équivalente à celle des autres amorces sens *MAGE-A* (0,25 μ M). En parallèle une PCR est effectuée en l'absence d'amorces *MAGE-A11*. La T_m pour cette amorce étant de 76°C, la température d'annealing de 65°C permet un taux d'hybridation élevé de cette amorce. Les concentrations des autres amorces utilisées restent les mêmes que précédemment et la PCR est effectuée pendant 35 cycles.

3.6.2 Résultats

Les résultats d'hybridation sur microdamier sont présentés à la figure 3.10. L'apparition d'un signal sur la sonde capteur *MAGE-A11* est observée suite à l'ajout de l'amorce spécifique sens. Les signaux ont été quantifiés pour chaque gène *MAGE-A* par le programme Imachips et les intensités moyennes sont portées en graphique (figure 3.11). Une augmentation du signal sur la sonde capteur *MAGE-A11* est bien observée suite à l'ajout de l'amorce spécifique sens. Le signal bien que assez faible est détecté par le programme Imachips. L'amorce spécifique sens *MAGE-A11* sera ajoutée au mélange PCR à une concentration de 0,25 μ M afin de mettre en évidence l'expression de ce gène lors des manipulations suivantes.

3.7 Marquage à la biotine et détermination de la limite de détection

Jusqu'à présent le marquage des amplicons était réalisé par l'incorporation de dUTP biotinylés. Afin d'évaluer s'il était encore possible d'accroître la sensibilité du test, nous avons testé un marquage par incorporation durant la PCR d'un mélange de dATP/dCTP biotinylés, ceci afin d'augmenter la proportion de nucléotides marqués incorporés. Les deux types de marquage ont été utilisés en parallèle pendant l'amplification de l'ADNc d'une lignée cellulaire tumorale de référence, MZ2-MEL. Pour estimer la limite de détection du test, différentes quantités d'ARN total extrait de cette lignée ont été rétrotranscrites, amplifiées par PCR triplex puis hybridées sur microdamier.

3.7.1 Conditions expérimentales

Le pattern d'expression des gènes *MAGE-A* dans la lignée MZ2-MEL est le suivant : *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A6* et *A10*, faiblement *A5* et *A12*. Le test a été réalisé au départ de différentes quantités d'ARN total extrait : 2 µg ; 0,2 µg ; 0,06 µg et 0,02 µg. Chaque quantité est rétrotranscrite, l'ADNc obtenu se trouve dans un volume final de 100 µl, la PCR est réalisée avec 1/40 de ce volume (2,5 µl). Les concentrations des différents dNTP sont les suivantes pour la marquage avec des dUTP biotinylés : 12,5 µM de dUTP biotinylés, 200 µM de dATP, dCTP et dGTP, 150 µM de dTTP. Pour le marquage par dATP/dCTP biotinylés, les concentrations sont les suivantes : 10 µM de dATP biotinylés et dCTP biotinylés, 150 µM de dATP et dCTP, 200 µM de dGTP et de dTTP. Pour le reste les conditions de PCR et d'hybridation des amplicons sont les mêmes que précédemment.

3.7.2 Résultats

Suite à l'hybridation sur microdamier, le pattern d'expression pour la lignée MZ2-MEL est correct (résultats non montrés). La sensibilité du test semble être plus élevée pour le double marquage dATP/dCTP biotinylés. Des signaux sont observés au départ de 0,02 µg d'ARN total avec ce marquage, alors que pour le marquage avec dUTP biotinylés aucun signal n'est détecté à cette même concentration. Les signaux ont été quantifiés par le programme Imachips. Les intensités moyennes pour les différents gènes *MAGE-A* sont reprises dans les graphiques figure 3.12, marquage dUTP biotinylés et figure 3.13, marquage dATP/dCTP biotinylés. Au départ de 2 µg d'ARN, l'intensité moyenne des signaux pour chaque gène *MAGE-A* exprimé est de même ordre pour les deux marquages. Lorsque l'on se situe plus bas que 2 µg l'intensité des moyenne des signaux est plus élevée pour les amplicons marqués par l'incorporation de dATP/dCTP biotinylés.

Pour déterminer la limite de détection pour chacune des conditions de marquage, le programme de détection d'Imachips a été utilisé. Ce programme donne une réponse de type oui ou non quant à l'expression des différents gènes *MAGE-A*, il se base sur l'utilisation de coefficient de corrélation (cf. matériel et méthodes 2.7). Le seuil de détection est fixé à une valeur de coefficient de corrélation de 0,25. Au dessus de cette valeur, les gènes sont considérés comme étant exprimés (+) et en dessous de ce seuil, comme étant non exprimés (-). Le détection des gènes *MAGE-A* exprimés dans la lignée MZ2-MEL est présentée dans le tableau à la figure 3.14 pour les différentes quantités d'ARN total de départ. Pour le

marquage réalisé avec les dUTP biotinylés, la limite de détection est de 2 µg d'ARN total alors que pour le double marquage, elle est de 0,2 µg d'ARN.

Il est intéressant de détecter les gènes *MAGE-A* au départ de faibles quantités d'ARN total. En effet, les tumeurs de petites tailles ne permettent pas le prélèvement d'une quantité de tissu suffisante pour extraire 2 µg d'ARN total. Par exemple, une biopsie de la taille d'une tête d'épingle permet une extraction de l'ordre de 0,5 µg d'ARN.

Le marquage dATP/dCTP biotinylés sera utilisé pour la suite des manipulations afin de permettre la détection de quantités d'ARN inférieures à 2 µg.

3.8 Reproductibilité du test

Afin de tester l'application des conditions de PCR et d'hybridation mises en place dans des laboratoires de recherche différents, l'amplification d'ADNc d'une lignée cellulaire de référence LB1751-MEL a été effectuée par différents appareils PCR d'un même fabricant ou de fabricants différents couramment utilisés. Jusqu'à présent toutes les PCR ont été réalisées sur le même appareil PCR, Perkin Elmer 9600. Cette expérience a été réalisée avant l'ajout d'une amorce sens spécifique du gène *MAGE-A11* et l'utilisation du double marquage dATP/dCTP biotinylés. Pour le reste les conditions d'amplification sont les mêmes que précédemment.

3.8.1 Conditions expérimentales

Le pattern d'expression des gènes *MAGE-A* dans la lignée LB373-MEL est *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A6*, *A10*, *A11* et *A12*, faiblement *A5* et *A9*. L'amplification a été testée sur différents appareils PCR : Perkin Elmer 9600, 9700, 2400A, 2400B et 2400C, TRIO-Thermoblock Biometra, Biozym MJ Research PTC-225 Thermal Cycler et MJ Research PTC-200 Thermal Cycler. L'hybridation sur microdamier est réalisée dans les conditions optimales.

3.8.2 Résultats

Les résultats de l'hybridation montrent un pattern d'expression correct des gènes *MAGE-A* pour la lignée cellulaire tumorale LB373-MEL, à l'exception du gène *MAGE-A11* qui n'est pas détecté. Un exemple du résultat obtenu pour l'appareil Perkin Elmer 9600 est présenté à la figure 3.15. Afin d'avoir un aperçu global de la variabilité obtenue d'un appareil à l'autre, l'intensité moyenne des signaux pour chaque gène *MAGE-A* a été quantifiée par le programme Imachips. Ces données sont portées en graphique (figure 3.16) pour chacun des appareils PCR utilisé. Une certaine variabilité est observée dans l'intensité des signaux obtenus pour chaque gène *MAGE-A* selon l'appareil PCR utilisé. La variabilité observée dépend non seulement des paramètres inhérents à chaque appareil, mais également des étapes de préparation de la PCR, d'hybridation et de détection. Le coefficient de variation a été calculé pour chaque gène *MAGE-A* (tableau 3.5). Le coefficient de variation du pattern obtenu entre les différents appareils reste peu élevé pour les gènes fortement exprimés dans l'échantillon (entre 4 et 10%). Il est plus élevé pour les gènes exprimés à un taux proche de la limite de détection. En effet, de petites différences dans l'efficacité du test seront plus marquées pour ces signaux que pour des signaux proches de la saturation. Le coefficient de variation est également plus élevé pour les gènes qui ne sont pas exprimés dans l'échantillon. Cette variation pourrait dépendre de l'étape de détection en colorimétrie, le précipité d'argent

ne se déposant pas de façon homogène sur les sondes capteurs non hybridées et sur la lame ne comportant pas d'ADN capteur.

Cependant même si l'intensité des signaux varie d'un appareil à l'autre, le pattern d'expression des gènes *MAGE-A* dans la lignée LB373-MEL est correct pour chacun des réplicats, à l'exception du gène *MAGE-A11*. L'expression du gène *MAGE-A11* n'est détectée dans aucun des produits PCR obtenus, quel que soit l'appareil PCR utilisé. Ceci justifie la nécessité d'ajouter une amorce spécifique sens du gène *MAGE-A11* afin de pouvoir le détecter. *MAGE-A3* est nettement détecté dans tous les cas. La concentration en amorces spécifiques *MAGE-A3* de 4 μ M donne donc une bonne efficacité d'amplification pour ce gène.

Suite à l'amplification par certains appareils (TRIO-Thermoblock Biometra), de très faibles signaux ont été observés sur les sondes capteurs *MAGE-A8* et *MAGE-A7*. *MAGE-A7* étant un pseudogène, il n'est donc jamais exprimé. *MAGE-A8* n'est pas exprimé dans la lignée cellulaire LB373-MEL. Il est probable que ces signaux proviennent de l'hybridation d'amplicons issus d'ADNg contaminant l'échantillon d'ARN. La présence d'ADNg pose problème car elle peut entraîner l'apparition de signaux faux positifs pour des gènes *MAGE-A* non exprimés. La manipulation suivante va permettre de déterminer la quantité limite d'ADNg pouvant être tolérée dans un échantillon d'ARN extrait.

3.9 Limite de détection d'ADNg sur microdamier

L'hybridation de différentes quantités d'ADNg amplifié dans les conditions définies de PCR triplex a permis d'évaluer la limite de détection sur microdamier.

Le calcul de la quantité maximale d'ADNg pouvant contaminer 2 μ g d'ARN total extrait, quantité utilisée pour la rétrotranscription, a permis de déterminer les quantités d'ADNg à tester. Une cellule comprend environ 10 pg d'ARN total. Pour extraire 2 μ g d'ARN total, il faudra environ 200000 cellules. Suite à la rétrotranscription, on utilise pour une PCR 1/40 de la quantité d'ADNg produit, ce qui correspondrait à la quantité d'ARN total présente dans 5000 cellules. Une cellule comprend environ 6 pg d'ADNg. Pour 5000 cellules, la quantité maximale d'ADNg pouvant être extraite et pouvant contaminer l'échantillon d'ARN total, s'il n'est pas purifié, est de 30 ng. Nous avons donc choisi d'amplifier par PCR triplex les quantités d'ADNg suivantes : 60 ng, 30 ng, 3 ng et 0,3 ng. Les amplicons sont ensuite hybridés sur microdamier. La réalisation du test au départ de 30 ng d'ADNg, correspond à l'utilisation d'un échantillon de 2 μ g d'ARN total non purifié. Les taux de purification correspondants à l'utilisation de 3 ng et 0,3 ng d'ADNg au départ du test sont respectivement de 90% et de 99%.

3.9.1 Conditions expérimentales

L'ADNg nous a été fourni par l'Institut Ludwig de Bruxelles à une concentration de 23,3 ng/ μ l. Les quantités d'ADNg suivantes ont été amplifiées par PCR triplex : 60 ng, 30 ng, 3 ng et 0,3 ng. La PCR a été réalisée dans les conditions mises au point précédemment. L'amorce sens spécifique de *MAGE-A11* est présente et le marquage par incorporation de dATP/dCTP biotinylés dans les amplicons est utilisé. L'hybridation et la détection colorimétrique ont été réalisées dans les conditions optimales.

3.9.2 Résultats

Les amplicons ont été déposés sur gel d'agarose pour une électrophorèse, ainsi la taille et l'absence de contamination ont pu être vérifiées. Comme les amorces de *MAGE-D2* sont situées dans des exons différents, la bande d'ADN correspondant à l'amplicon *MAGE-D2* a une taille de 650 pb, alors qu'elle est de 450 pb au départ d'ADNc (figure 3.17). La bande d'ADN correspondant aux gènes *MAGE-A* présente une taille de 540 pb, leurs amorces se situant dans le même exon.

Les résultats de l'hybridation sont présentés à la figure 3.18. Aucun signal n'est observé pour l'hybridation d'amplicons *MAGE-A* et *D2* obtenus au départ de 0,3 ng d'ADNg, alors qu'au départ des quantités supérieures des signaux sont observés sur plusieurs sondes capteurs. Notons que pour 3 ng d'ADNg l'hybridation sur microdamier met en évidence des signaux sur certaines sondes alors que l'on n'observe aucune bande sur gel après électrophorèse. Cette différence de sensibilité peut s'expliquer par le volume d'amplicons mis à hybrider (20 µl) par rapport au dépôt sur gel (3 µl). L'intensité moyenne des signaux a été déterminée par le programme Imachips. Ces données sont portées en graphique (figure 3.19). Tous les gènes *MAGE-A* et *MAGE-D2* sont détectés pour l'hybridation d'amplicons obtenus au départ de 60 et 30 ng d'ADNg, ce qui implique la nécessité de purification des échantillons d'ARN totaux extraits avant de les rétrotranscrire. En hybridant les amplicons issus de 3 ng d'ADNg, des signaux sont encore détectés pour 9 gènes *MAGE-A* et pour le gène *MAGE-D2*. Enfin, pour un test réalisé au départ de 0,3 ng d'ADNg, aucun signal n'est détecté. La limite d'ADNg pouvant contaminer un échantillon de 2 µg d'ARN total sans occasionner de résultats faux positifs se situe donc entre 3 et 0,3 ng. L'échantillon d'ARN extrait devra présenter un taux de purification d'ADNg compris entre 90 et 99%.

MAGE-A7 étant un pseudogène, aucun signal ne doit être détecté sur sa sonde capteur. Dans cette expérience, le programme détecte un signal sur la sonde capteur *MAGE-A7* pour des amplicons obtenus au départ de 3 ng d'ADNg. La sonde capteur *MAGE-A7* peut être considérée comme un bon indicateur de la présence d'ADNg contaminant. Afin de diminuer les risques d'amplifier de l'ADNg dans un échantillon, deux solutions peuvent être envisagées. La première consiste à systématiquement traiter les échantillons d'ARN à la DNase. La deuxième est de diminuer le nombre de cycles PCR à 30 cycles. Cette dernière proposition sera évaluée pour les raisons suivantes. Lors de l'étude réalisée précédemment sur 32 échantillons, 30 cycles de PCR ont été appliqués sans entraîner l'apparition de signaux faux positifs sur la sonde capteur *MAGE-A7* (Zammatteo et al., 2002b). Pour confirmer l'absence d'ADNg contaminant des réactions de RT-PCR sans rétrotranscriptase ont été effectuées pour les 32 échantillons d'ARN. Aucun signal n'a été mis en évidence sur aucune sonde du damier. Il est donc probable qu'à 30 cycles de PCR le risque de mettre en évidence de l'ADNg soit réduit par rapport à 35 cycles.

3.10 Analyse comparative de l'expression des gènes *MAGE-A* dans des tissus tumoraux

La dernière étape de ce travail est de comparer la méthode développée au cours du mémoire à la méthode de référence utilisée à l'Institut Ludwig de Bruxelles.

3.10.1 Conditions expérimentales

Différents critères ont été pris en compte pour la sélection des échantillons afin d'évaluer si les objectifs du mémoire pouvaient être atteints. Un des échantillons n'exprime aucun gène *MAGE-A*. Un autre échantillon exprime *MAGE-A6* en l'absence de *MAGE-A3* et permet d'évaluer la discrimination de ces deux gènes. Deux échantillons expriment *MAGE-A11* ont également été inclus dans cette étude afin d'évaluer si l'ajout de l'amorce spécifique de *MAGE-A11* permet bien la détection de ce gène. Les échantillons de tissus tumoraux ont été fournis par l'Institut Ludwig de Bruxelles. Les échantillons ont été amplifiés dans les conditions de PCR triplex définies précédemment par 30 et 35 cycles de PCR. La réalisation de la PCR en 30 cycles parallèlement à 35 a été décidée afin d'évaluer si le risque d'obtenir des résultats faux positifs par contamination de l'échantillon par de l'ADNg pouvait être réduit. Les amplicons ont été hybridés sur microdamier en deux réplicats pour chaque condition d'amplification. Les hybridations ont été réalisées dans les conditions optimales.

3.10.2 Résultats

Une électrophorèse sur gel d'agarose a été réalisée afin de vérifier la taille des amplicons et l'absence de contamination (figure 3.20). Le profil électrophorétique correspond à 30 cycles de PCR, un profil similaire a été obtenu pour 35 cycles. Les amplicons présentent bien la taille attendue, 540 pb pour les gènes *MAGE-A* et 450 pb pour *MAGE-D2*. Pour l'échantillon de tissu tumoral 1265, une seule bande d'ADN est visible, il s'agit de la bande correspondant à *MAGE-D2*, en effet, cet échantillon n'exprime aucun des gènes *MAGE-A*.

Le pattern d'expression a été déduit des signaux détectés sur les 3 sondes capteurs de chaque gène pour les deux réplicats obtenus comme l'explique la légende de la figure 3.21. Le tableau 3.6 reprend les pattern d'expression obtenus pour ces 5 échantillons par la méthode de référence utilisée à l'Institut Ludwig de Bruxelles et par hybridation sur microdamier suite à une PCR triplex.

Une corrélation parfaite est observée par les deux méthodes pour les gènes fortement exprimés ainsi que pour ceux qui ne sont pas exprimés dans les différents échantillons. Les résultats obtenus pour l'échantillon 2724, qui exprime le gène *MAGE-A6* et non le gène *MAGE-A3*, indiquent l'absence d'hybridation croisée sur la sonde capteur de *MAGE-A3* d'amplicons *MAGE-A6*. La spécificité des amorces utilisées pour l'amplification de *MAGE-A3* est confirmée. Le gène *MAGE-A11* est bien détecté dans les 2 échantillons, 2336 et 4109 qui l'expriment. La PCR comprenant 0,25 μ M d'amorce sens spécifique *MAGE-A11* présente une efficacité suffisante pour l'amplification de ce gène.

Des discordances apparaissent entre les résultats obtenus avec les deux méthodes pour des gènes dont le taux d'expression est proche de la limite de détection de l'une ou l'autre méthode. Les discordances indiquées en gras dans le tableau correspondent aux gènes détectés faiblement par la méthode de référence et détectés uniquement après 35 cycles sur

microdamier. La méthode de référence est donc légèrement plus sensible que le test sur microdamier après 30 cycles de PCR.

Les discordances soulignées dans le tableau sont les gènes non détectés par la méthode de référence et détectés sur microdamier après 30 cycles de PCR (faiblement) et/ou 35 cycles de PCR. Il est difficile d'évaluer si ces signaux traduisent des gènes réellement exprimés ou bien s'ils correspondent à des faux positifs provenant d'ADNg compte tenu de l'absence signal sur la sonde capteur *MAGE-A7*. Pour confirmer l'une ou l'autre hypothèse des expériences complémentaires seraient à réaliser. L'absence de contamination par de l'ADNg pourrait être confirmée en réalisant une PCR sur des échantillons non rétrotranscrits, suivie d'une hybridation sur microdamier. L'absence de signal traduirait une absence de contamination par de l'ADNg. Ces échantillons pourraient également être testés par la méthode de référence en augmentant le nombre de cycles de RT-PCR afin de voir si les gènes sont alors détectés.

A partir des résultats obtenus pour ces différents échantillons, nous avons calculé la spécificité et la sensibilité du test sur microdamier (tableau 1.5 présenté dans les objectifs). Le pattern d'expression a été comparé à celui obtenu par la méthode de référence. Dans cette évaluation, la méthode de référence est considérée comme ayant une spécificité et une sensibilité de 100%. La sensibilité du test est la capacité d'identifier les gènes réellement exprimés dans un échantillon. Elle est de 89% lorsque le test comprend 30 cycles de PCR et de 100% pour 35 cycles de PCR. La spécificité est la capacité d'identifier les gènes réellement non exprimés dans l'échantillon. Quand le test comprend 30 cycles, la spécificité du test est de 97% et pour 35 cycles, elle est de 94%. La probabilité qu'un gène détecté soit réellement exprimé dans l'échantillon est de 96% lorsque 30 cycles de PCR sont effectués et de 93 % pour 35 cycles de PCR. La probabilité qu'un gène non détecté ne soit réellement pas exprimé dans l'échantillon est de 91 % lorsque 30 cycles de PCR sont effectués et de 100 % pour 35 cycles PCR.

La spécificité serait donc plus grande après 30 cycles de PCR alors que la sensibilité serait accrue après 35 cycles de PCR. Dans le cas présent, il est préférable d'être le plus spécifique possible même si on omet la mise en évidence de gènes faiblement exprimés. 30 cycles de PCR serait donc un bon choix car les gènes fortement exprimés et ceux non exprimés sont détectés efficacement et la spécificité est proche de 100%.

Les chiffres de spécificité et de sensibilité pourraient être remis en question si l'absence de contamination par de l'ADNg est mise en évidence dans les échantillons 2336 et 4109. 35 cycles serait donc plus adéquat car la spécificité et la sensibilité atteindraient 100%. Une évaluation du test à 30 et 35 cycles sur un plus grand nombre d'échantillons permettrait de déterminer avec plus de sécurité le nombre de cycles à utiliser.

Conclusions et perspectives

L'objectif de ce mémoire était d'optimiser la stratégie de PCR triplex utilisée dans la méthode de discrimination des gènes *MAGE-A* sur microdamier à ADN. Les résultats que nous avons obtenus montrent que les amorces spécifiques du gène *MAGE-A3* amplifient uniquement ce gène et non *MAGE-A6*, ces deux gènes présentant 98% d'identité sont donc discriminés sans ambiguïté. Le gène *MAGE-D2* utilisé comme contrôle endogène a également été bien détecté dans tous les échantillons testés. Ceci montre qu'il constitue un bon contrôle des étapes précédant l'hybridation.

Cette méthode permet l'identification rapide des gènes *MAGE-A* exprimés dans un échantillon tumoral en une seule PCR, contrairement à la méthode de référence de l'Institut Ludwig qui nécessite l'emploi d'amorces spécifiques dans des tubes différents. De plus, l'électrophorèse n'est plus nécessaire et l'utilisation de l'agent mutagène « bromure d'éthidium » peut être évitée.

Cependant, le test développé en cours de ce travail n'est pas quantitatif. Il n'est pas possible de corrélérer la quantité de cible détectée à la quantité d'ARN de départ. Ce test permet un criblage rapide des gènes exprimés pouvant être candidats pour une immunisation. Le niveau d'expression des gènes candidats devra être déterminé par la méthode de référence, RT-PCR semi-quantitative, avant d'entreprendre des essais cliniques.

La spécificité et la sensibilité du test ont été améliorées en optimisant les étapes de PCR triplex, d'hybridation et de détection en colorimétrie. Tout d'abord, la spécificité du test a pu être augmentée en optimisant les conditions d'hybridation et de détection en colorimétrie. La sensibilité du test a été augmentée en réalisant un nombre plus élevé de cycles PCR, en augmentant la concentration en amorces spécifiques *MAGE-A3* et en utilisant le double marquage dATP/dCTP biotinylés. L'ajout d'une amorce spécifique sens pour le gène *MAGE-A11* a également été nécessaire afin d'amplifier ce gène avec une efficacité comparable à celle des autres gènes *MAGE-A* lorsqu'il est exprimé.

Suite à ces mises au point, nous avons déterminé la limite de détection du test au départ de différentes quantités d'ARN total extraites d'une lignée cellulaire tumorale de référence, MZ2-MEL. La limite de détection du test se situe à 0,2 µg d'ARN total pour cette lignée de référence.

La reproductibilité du test a ensuite été évaluée par l'utilisation de dix appareils PCR différents. Les résultats indiquaient que le test est reproductible pour les gènes fortement exprimés. La variabilité est plus élevée pour des gènes faiblement ou non exprimés. Cette expérience a mis en évidence l'amplification occasionnelle d'ADNg par certains appareils PCR.

Nous avons alors déterminé la quantité minimale d'ADNg pouvant être détectée sur microdamier. Cette limite se situe entre 0,3 et 3 ng d'ADNg, ce qui correspondrait à l'élimination de 90 à 99% de l'ADNg lors de l'extraction de 2 µg d'ARN.

Finalement, le test mis au point a été comparé à la méthode de référence pour la détection des gènes *MAGE-A* exprimés dans cinq échantillons de tissus tumoraux. Une corrélation parfaite est observée entre les résultats de détection par les deux méthodes pour les

gènes fortement exprimés ainsi que pour ceux qui ne sont pas exprimés par les différents échantillons. La spécificité des amorces *MAGE-A3* a été vérifiée pour un échantillon exprimant *MAGE-A6* et non *MAGE-A3*, aucun signal n'a été détecté sur la sonde capteur *MAGE-A3*. Le gène *MAGE-A11* est bien détecté dans les échantillons qui l'expriment.

Des discordances ont été observées entre les deux méthodes pour les gènes faiblement exprimés. Certains gènes détectés par la méthode de référence de l'Institut Ludwig ne sont détectés sur microdamier qu'après 35 cycles de PCR. D'autres n'avaient pas été détectés par la méthode utilisée à l'Institut Ludwig et sont détectés sur microdamier après 35 cycles de PCR.

La sensibilité et la spécificité du test ont été déterminées pour le test réalisé avec 30 et 35 cycles de PCR, en considérant la spécificité et la sensibilité de la méthode de référence comme étant de 100%. La sensibilité du test est de 89% lorsque le test comprend 30 cycles de PCR et de 100% pour 35 cycles de PCR. La spécificité du test de 97% lorsque le test comprend 30 cycles de PCR et de 94% pour 35 cycles de PCR.

Les signaux obtenus sur microdamier pour des gènes dont l'expression n'avait pas été détectée par la méthode de référence pourraient correspondre à des faux positifs provenant d'ADNg. Cela pourrait être vérifié en réalisant une RT-PCR sans rétrotranscriptase à partir des échantillons exprimant ces gènes, suivie d'une hybridation sur microdamier. Ces mêmes échantillons pourraient être testés par la méthode de référence avec un plus grand nombre de cycles de RT-PCR afin de voir si ces gènes sont alors détectés. Si ces signaux s'avèrent être de véritables faux positifs, un nombre de 30 cycles PCR devrait être effectué avant hybridation sur microdamier afin de favoriser la spécificité du test. S'il s'agit de gènes réellement exprimés par l'échantillon, un nombre 35 cycles de PCR devrait être choisi, ainsi la spécificité et la sensibilité du test seraient de 100%.

Dans le but d'éviter les résultats faux positifs dû à une contamination de l'échantillon d'ARN par de l'ADNg, les conditions d'extraction et de rétrotranscription pourraient être optimisées, un traitement de l'échantillon d'ARN extrait avec une DNase permettrait d'éliminer efficacement l'ADNg.

Une validation sur un plus grand nombre d'échantillons permettrait de confirmer ces résultats, 50 à 100 échantillons devraient être testés en parallèle de la méthode référence.

Si suite à cette validation des résultats corrects sont obtenus, le test pourrait contribuer à l'élaboration d'un kit de discrimination des différents gènes *MAGE-A*. L'utilisation d'une telle méthode serait intéressante dans le cadre de la vaccination anti-tumorale et également pour la caractérisation des tumeurs.

Tableau 3.1

Comparaison des séquences des sondes capteurs *MAGE-A* et des séquences cibles *MAGE-A*^a.

Sondes capteurs	Séquence d'ADN cible des gènes <i>MAGE-A</i>										
	A1	A2	A4a	A5a	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
MAGE-A1	<u>100</u>	59	70	67	67	41	48	41	41	44	63
MAGE-A2	59	<u>100</u>	59	63	78	33	44	33	37	44	78
MAGE-A4	70	67	<u>100</u>	85	67	37	48	41	15	37	63
MAGE-A5	67	74	81	<u>100</u>	85	30	41	33	15	26	70
MAGE-A6	<u>92</u>	<u>92</u>	88	85	<u>100</u>	70	88	74	78	81	<u>92</u>
MAGE-A7	52	48	48	48	55	<u>100</u>	70	63	37	52	44
MAGE-A8	52	48	48	48	52	70	<u>100</u>	74	48	59	48
MAGE-A9	48	41	44	44	48	63	74	<u>100</u>	33	48	48
MAGE-A10	37	48	55	48	52	44	44	37	<u>100</u>	67	44
MAGE-A11	44	48	55	48	44	52	55	48	67	<u>100</u>	41
MAGE-A12	63	74	63	67	78	59	70	74	33	52	<u>100</u>

^a Les données sont le pourcentage d'identité des nucléotides entre les séquences sondes et les séquences cibles, les pourcentages d'identité supérieur à 90% sont soulignés (Zammatteo et al., 2002b).

Tableau 3.2

Conditions testées	Conditions sélectionnées
<p>➡ <u>Lavages post-hybridation</u> Stringence des lavages Nombre de lavages</p>	<p>➡ <u>Lavages post-hybridation</u> 4x B1 dil. 500x</p>
<p>➡ <u>Agent bloquant</u> Gloria gélule 1 mg Gloria gélule 10 mg</p>	<p>➡ <u>Agent bloquant</u> Gloria gélule 1 mg</p>
<p>➡ <u>Conjugué (anti-biotine)</u> Dilution 100x Dilution 200x</p>	<p>➡ <u>Conjugué</u> Dilution 200x</p>
<p>➡ <u>Lavages post-conjugué</u> Stringence des lavages Nombre de lavages</p>	<p>➡ <u>Lavages post-conjugué</u> 3x B1 dil. 10x + Tween 0.1% + 2x B1 dil. 200x</p>

Tableau 3.3

Conditions optimales	
Hybridation T°	65 °C
Hybridation tampon	PO4 0,6 M pH 7,4
Dénaturation amplicons	NaOH 0,175N 5 minutes
Volume des amplicons	20 µl
Hybridation temps	30 minutes
Lavages post-hybridation	4 x B1 dilué 500x
Agent bloquant	gélule Gloria 1 mg
Conjugué	dilution 200x
Lavages post-conjugué	3 x B1 dilué 10x + Tween 0.1% + 2 x B1 dilué 200 x

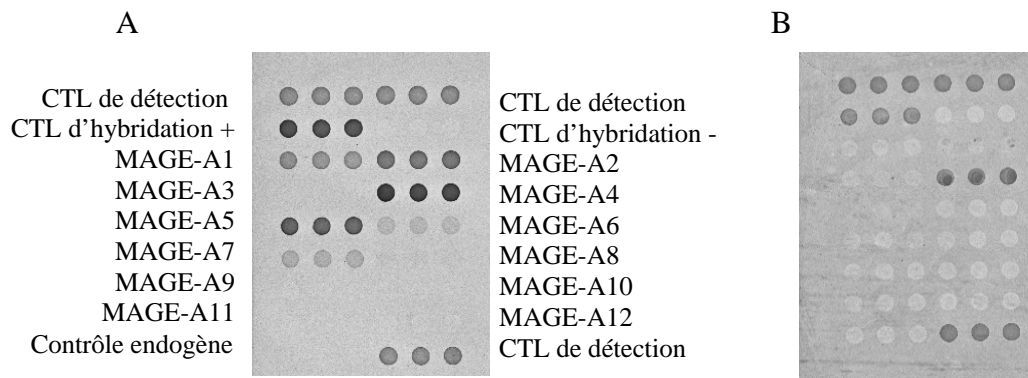


Figure 3.1

Effet de la stringence des lavages post-conjugué sur la spécificité d'hybridation.
 Hybridation d'amplicons obtenus à partir de plasmide recombinant *MAGE-A4*.
 A : trois lavages d'une minute dans du tampon B1 pH 7,5 dilué 10x + Tween 0,1% B : trois lavages de deux minutes du tampon B1 pH 7,5 dilué 10x + Tween 0,1% et deux lavages de deux minutes avec du tampon B1 pH 7,5 dilué 200x

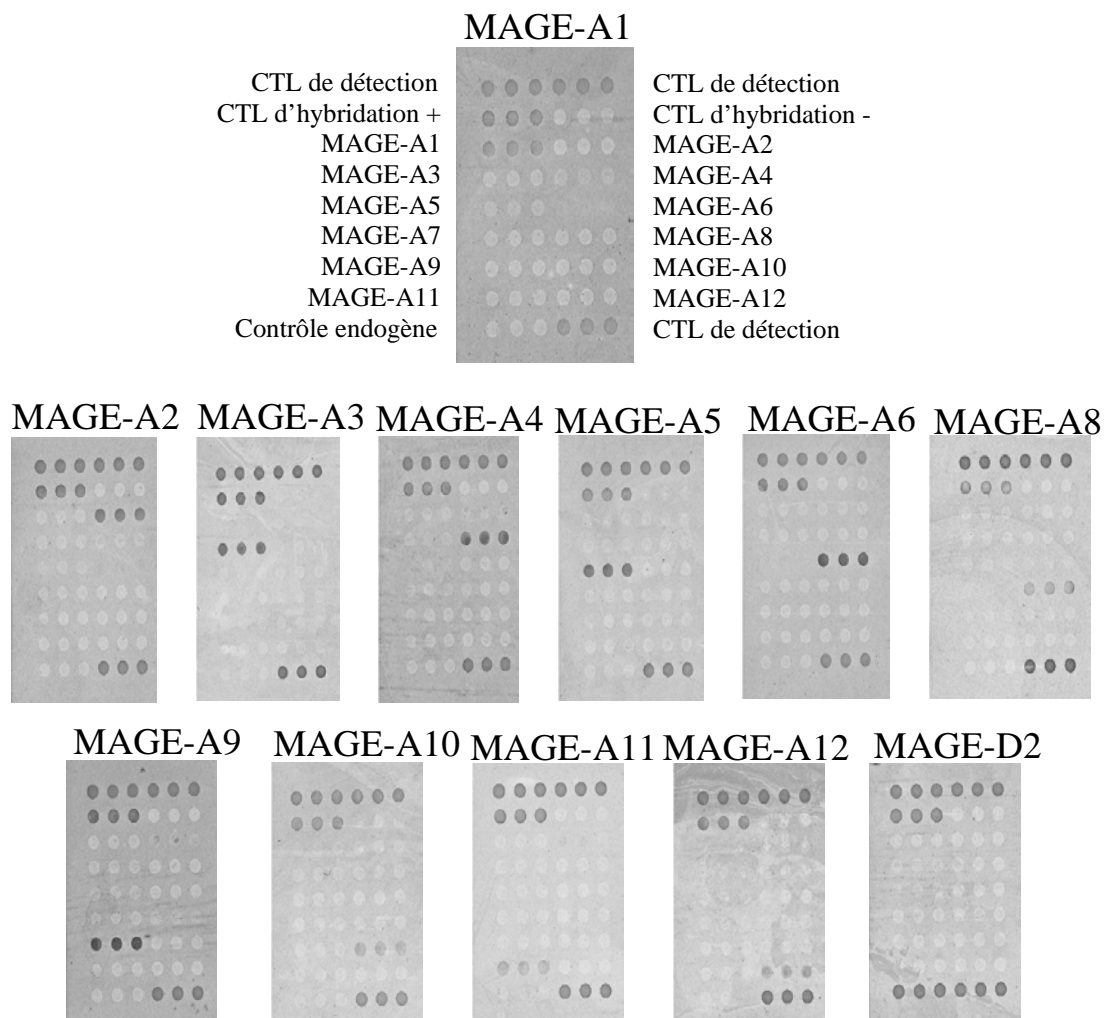


Figure 3.2

Test de la spécificité des conditions d'hybridation.
 Hybridation d'amplicons *MAGE-A* et *MAGE-D2* obtenus à partir de plasmides contenant pour l'ADNc de ces différents gènes.

Tableau 3.4

	Gènes <i>MAGE-A</i> exprimés											
	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>	<i>A5</i>	<i>A6</i>	<i>A7</i>	<i>A8</i>	<i>A9</i>	<i>A10</i>	<i>A11</i>	<i>A12</i>
LB373-MEL	+ ^a	+	+	+	(+)	+	-	-	(+)	+	+	+
LB905-BLC	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LB1751-MEL	+	+	+	+	(+)	+	-	+	-	+	(+)	(+)

^a Expression des gènes *MAGE-A* déterminée par la méthode de référence de l'Institut Ludwig de Bruxelles, RT-PCR semi-quantitative avec des amorces spécifiques. Le niveau d'expression du gène est déterminé par comparaison de l'intensité de la bande obtenue après électrophorèse sur gel d'agarose par rapport à un ADNc de référence amplifié en parallèle : + = moyennement à fortement exprimé, (+) = faiblement exprimé, - = non exprimé. L'expression est relative au pourcentage trouvé dans les lignées cellulaires de référence MZ2-MEL pour *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A5*, *A6*, *A10*, *A12* ; LB373-MEL pour *MAGE-A4*, *A9*, *A11* et TT (carcinome

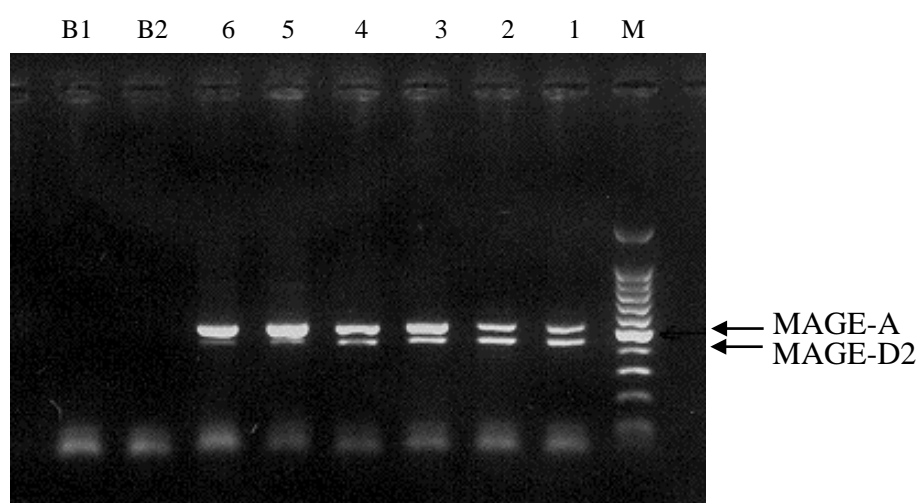


Figure 3.3

Profil électrophorétique d'amplicons obtenus à partir d'ADNc de différentes lignées cellulaires tumorales. M : 100 bp DNA Ladder ; 1 et 2 : LB905-BLC ; 3 et 4 : LB1751-MEL ; 5 et 6 : LB373-MEL ; B1 : blanc pièce PCR 1 ; B2 : blanc pièce PCR 2

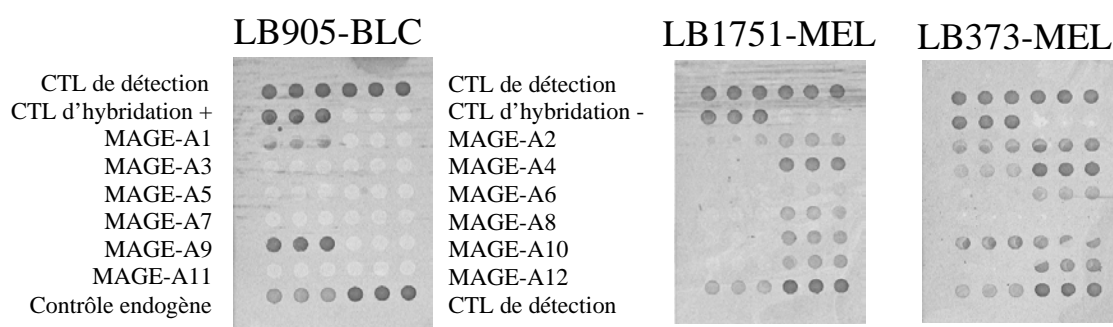


Figure 3.4

Test de la spécificité des conditions d'hybridation. Hybridation d'amplicons obtenus à partir d'ADNc de différentes lignées cellulaires tumorales de référence.

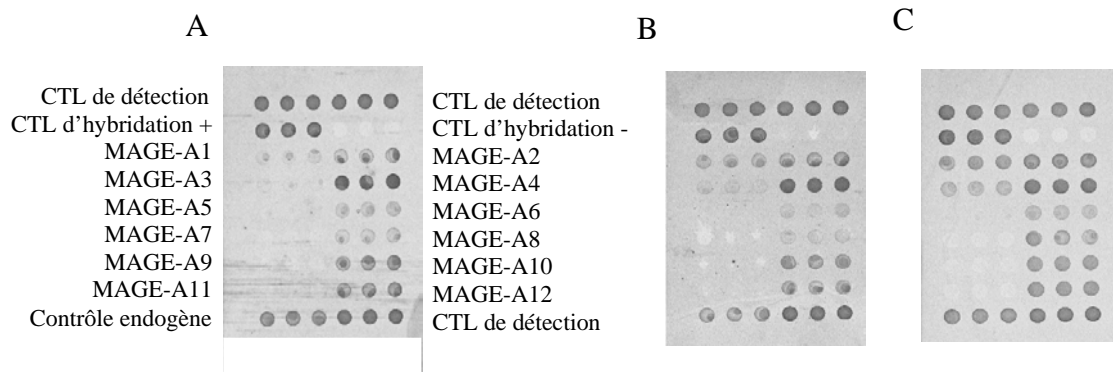


Figure 3.5

Effet du nombre de cycles PCR sur la sensibilité du test.
Hybridation d'amplicons obtenus à partir d'ADNc de la lignée cellulaire tumorale de référence LB1751-MEL.
A : 30 cycles PCR ; B : 33 cycles PCR ; C : 35 cycles PCR.

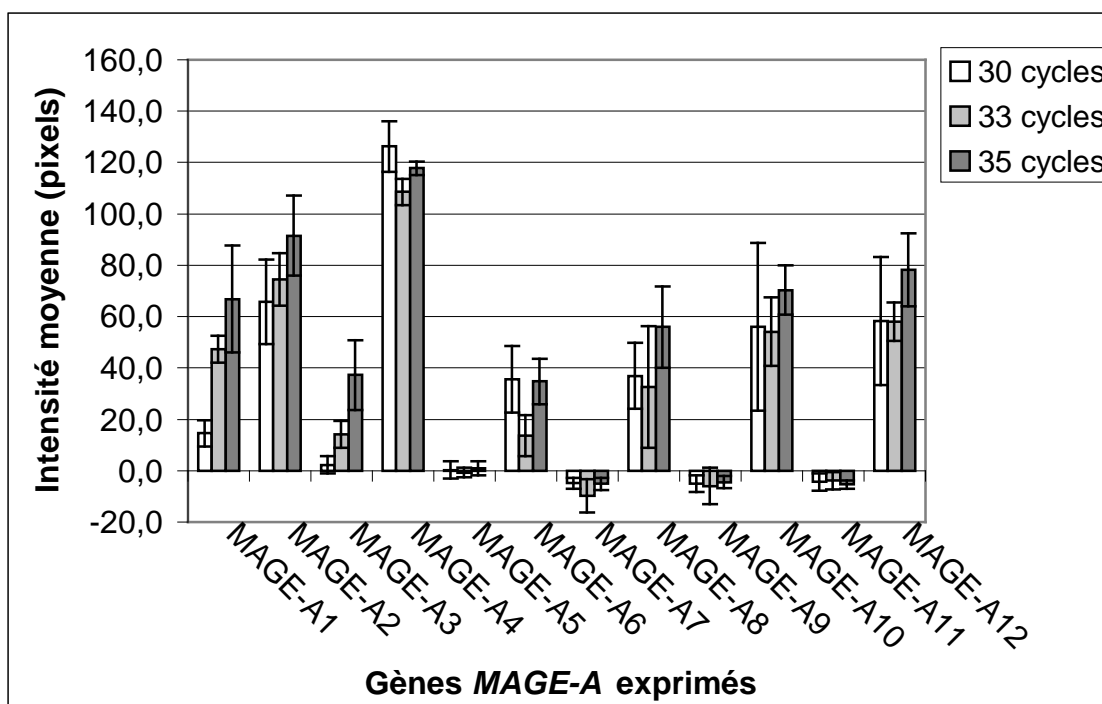


Figure 3.6

Quantification des signaux obtenus sur les damiers présentés à la figure 3.5.
Les valeurs des intensités représentent la moyenne de trois réplicats pour chaque sonde capteur \pm deux déviations standard (SD).

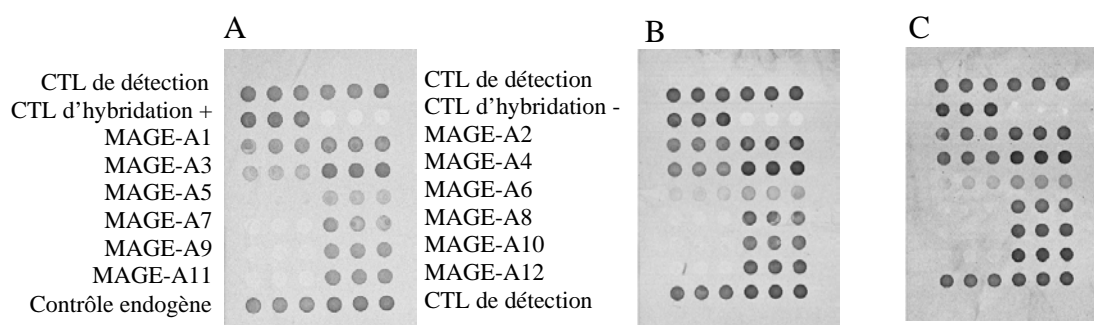


Figure 3.7

Effet de la concentration en amorces spécifiques *MAGE-A3* dans la PCR triplex sur la sensibilité du test.

Hybridation d'amplicons obtenus à partir d'ADNc de la lignée cellulaire tumorale de référence LB1751-MEL.

A : 1 μ M d'amorces *MAGE-A3* ; B : 2 μ M d'amorces *MAGE-A3* ; C : 4 μ M d'amorces *MAGE-A3*.

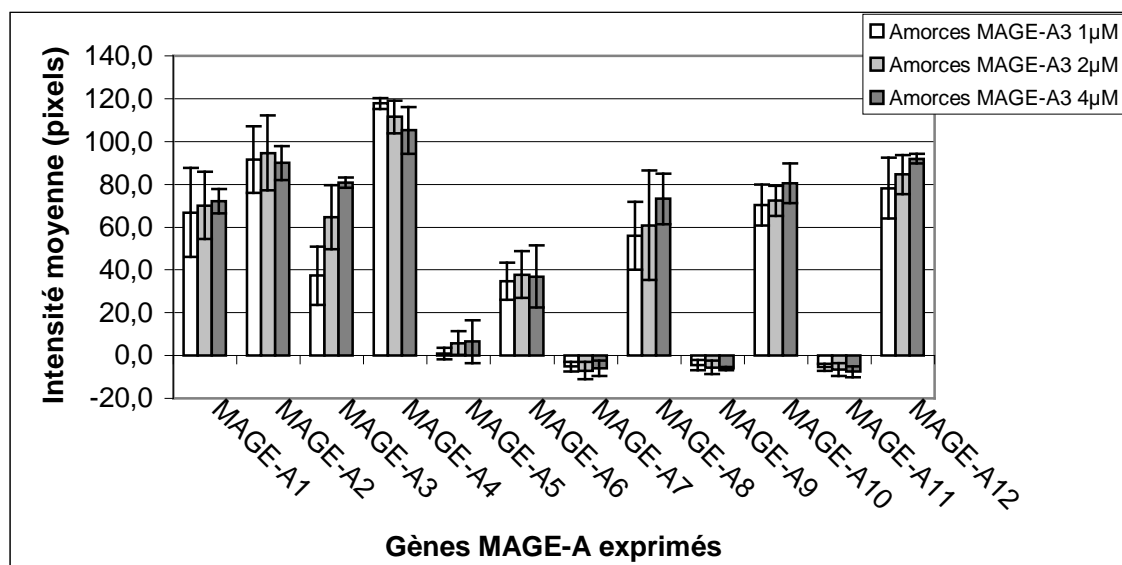


Figure 3.8

Quantification des signaux obtenus sur les damiers présentés à la figure 3.7.

Les valeurs des intensités représentent la moyenne de trois réplicats pour chaque sonde capteur \pm deux déviations standard (SD).

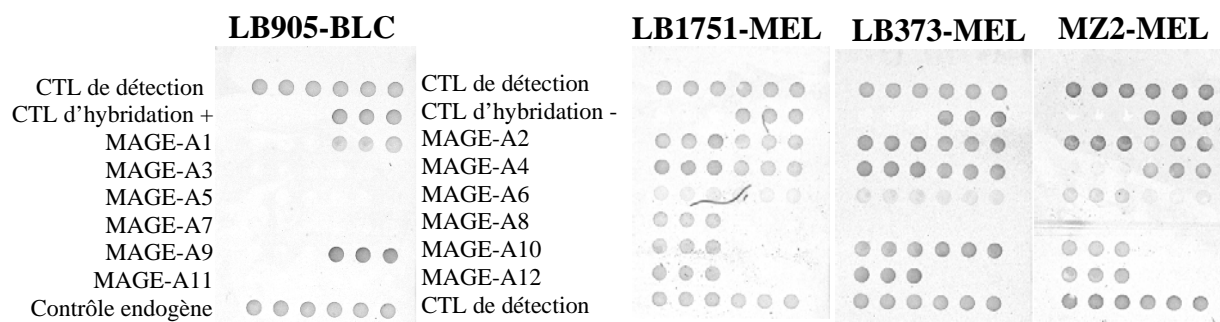


Figure 3.9

Sensibilité du test dans les conditions actuelles d'hybridation et de PCR. Hybridation d'amplicons obtenus à partir d'ADNc de différentes lignées cellulaires tumorales de référence LB905-BLC, LB1751-MEL, LB373-MEL et MZ2-MEL.

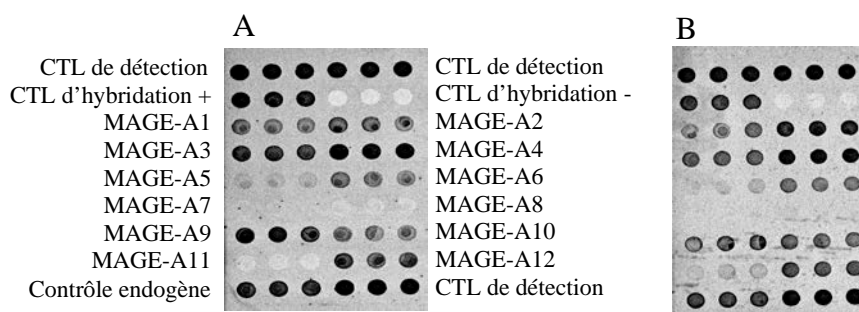


Figure 3.10

Effet de l'ajout d'une amorce spécifique sens *MAGE-A11* dans la PCR triplex. Hybridation d'amplicons obtenus à partir d'ADNc de la lignée cellulaire tumorale de référence LB373-MEL.

A : sans amorce *MAGE-A11* ; B : avec amorce *MAGE-A11*.

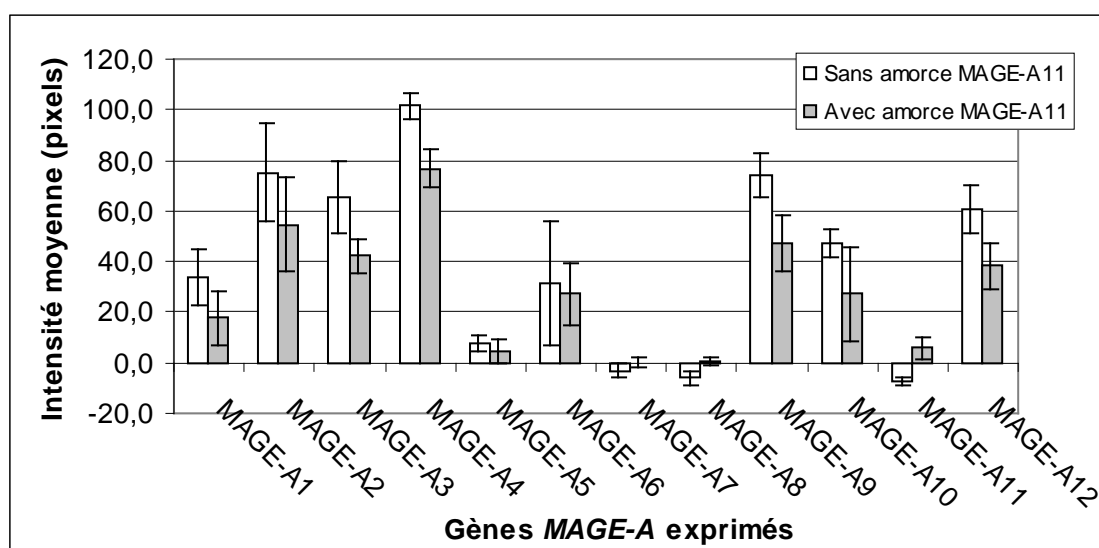


Figure 3.11

Quantification des signaux obtenus sur les damiers présentés à la figure 3.10. Les valeurs des intensités représentent la moyenne de trois réplicats pour chaque sonde capteur \pm deux déviations standard (SD).

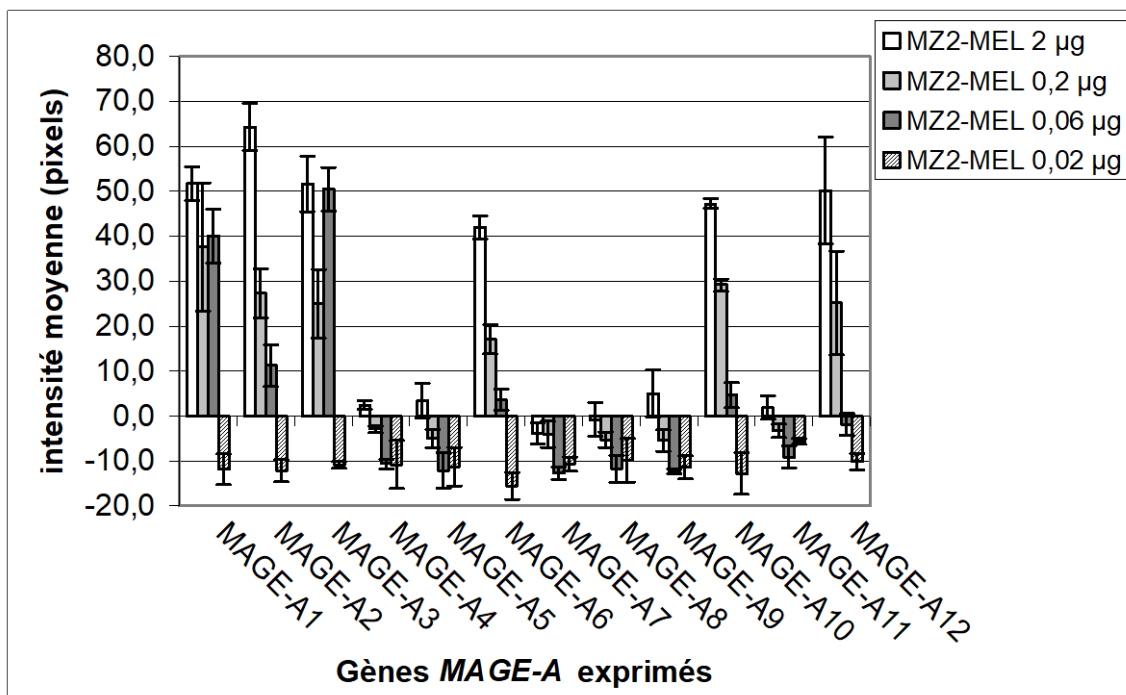


Figure 3.12

Quantification des signaux obtenus sur les damiers pour le marquage avec dUTP biotinylés.

Les valeurs des intensités représentent la moyenne de trois réplicats pour chaque sonde capteur \pm deux déviations standard (SD).

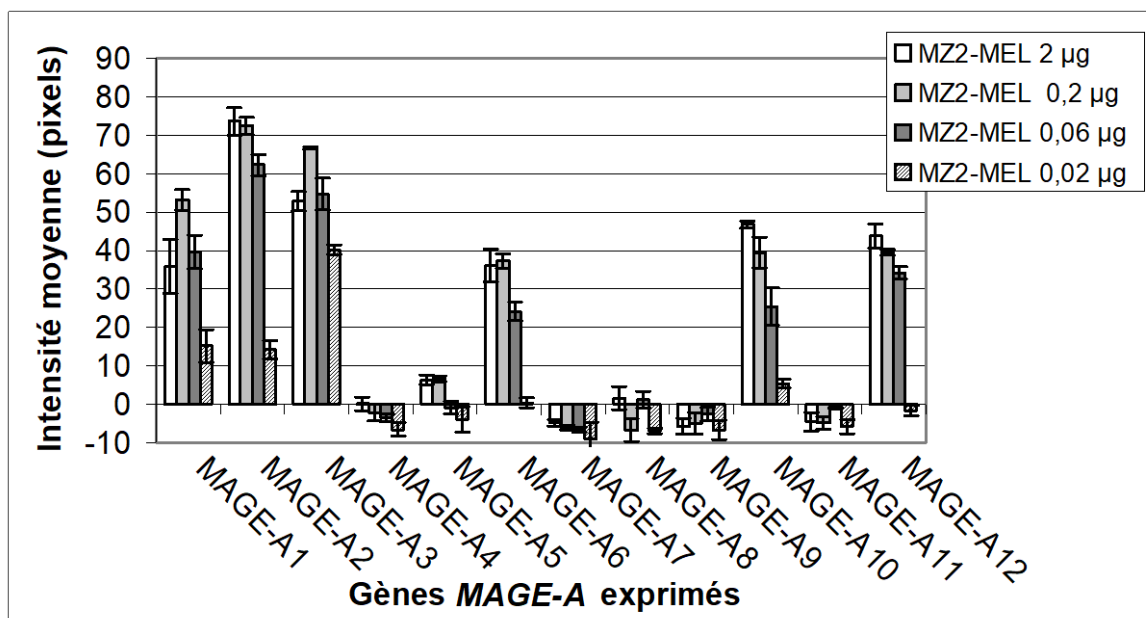


Figure 3.13

Quantification des signaux obtenus sur les damiers pour le marquage le mélange avec dATP/dCTP biotinylés.

Les valeurs des intensités représentent la moyenne de trois réplicats pour chaque sonde capteur \pm deux déviations standard (SD).

A	ARN total μg	ADNc des <i>MAGE-A</i> détecté dans la lignée MZ2-MEL						
		A1	A2	A3	A5	A6	A10	A12
	2	+	+	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	-	+	+	+
	0,06	+	+	+	-	+	+	+
	0,02	-	-	-	-	-	-	-

B	ARN total μg	ADNc des <i>MAGE-A</i> détecté dans la lignée MZ2-MEL						
		A1	A2	A3	A5	A6	A10	A12
	2	+	+	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+	+	+
	0,06	+	+	+	-	+	+	+
	0,02	+	+	+	-	-	-	-

Figure 3.14

Estimation de la limite de détection du test sur microdamier.

L'expression des gènes *MAGE-A* est déterminée dans les conditions optimales de PCR et d'hybridation. + représente la détection de l'expression du gène considéré ; - signifie qu'il n'y a pas de détection.

A : marquage réalisé à partir de dUTP biotinylés ; B : marquage réalisé à partir du mélange dATP/dCTP biotinylés.

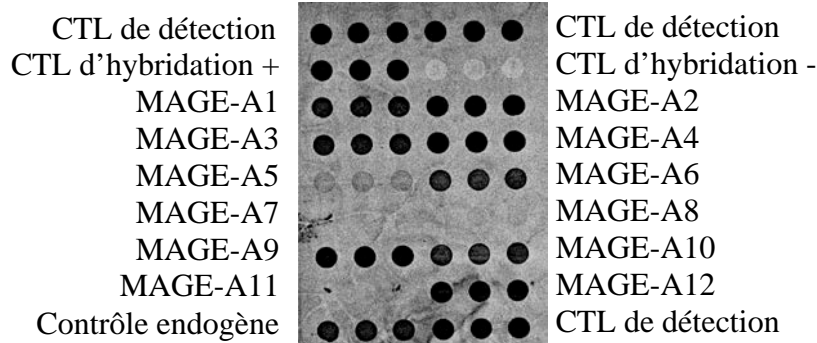


Figure 3.15

Hybridation d'amplicons obtenus à partir d'ADNc de la lignée cellulaire tumorale de référence LB373-MEL. L'amplification a été réalisée sur l'appareil PCR de référence : Perkin Elmer 9600.

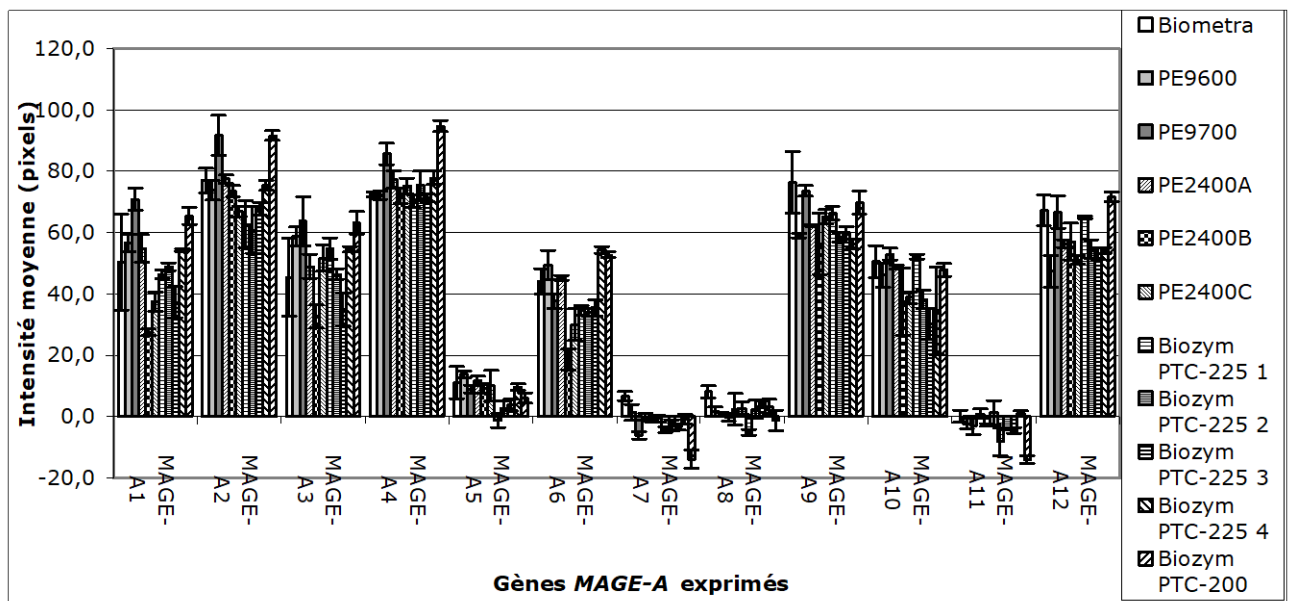


Figure 3.16

Quantification des signaux obtenus pour les damiers sur lesquels ont été hybridés les amplicons d'ADNc de la lignée cellulaire de référence LB373-MEL. Les amplifications ont été réalisées à partir de différents appareils PCR : Biometra TRIO-Thermoblock ; Perkin Elmer 9600, 9700, 2400 A, 2400 B et 2400 C ; Biozym (MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler et MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler). Les valeurs des intensités représentent la moyenne de trois réplicats pour chaque sonde capteur \pm deux déviations standard (SD).

	Moyenne	Ecart-types	Coefficient de variation (%)
MAGE-A1	50,0	3,8	7,6
MAGE-A2	74,5	3,6	4,8
MAGE-A3	50,5	4,6	9,1
MAGE-A4	76,8	2,4	3,1
MAGE-A5	9,0	2,3	25,1
MAGE-A6	39,7	2,5	6,4
MAGE-A7	11,7	1,5	12,8
MAGE-A8	6,9	2,1	30,3
MAGE-A9	64,0	3,3	5,2
MAGE-A10	43,4	4,5	10,5
MAGE-A11	10,7	1,9	17,4
MAGE-A12	58,6	2,9	4,9

Tableau 3.5

Calcul du coefficient de variation des intensités moyennes des signaux obtenus pour les gènes *MAGE-A* exprimés dans la lignée cellulaire de référence LB373-MEL suite à l'amplification de l'ADNc par différents appareils PCR.

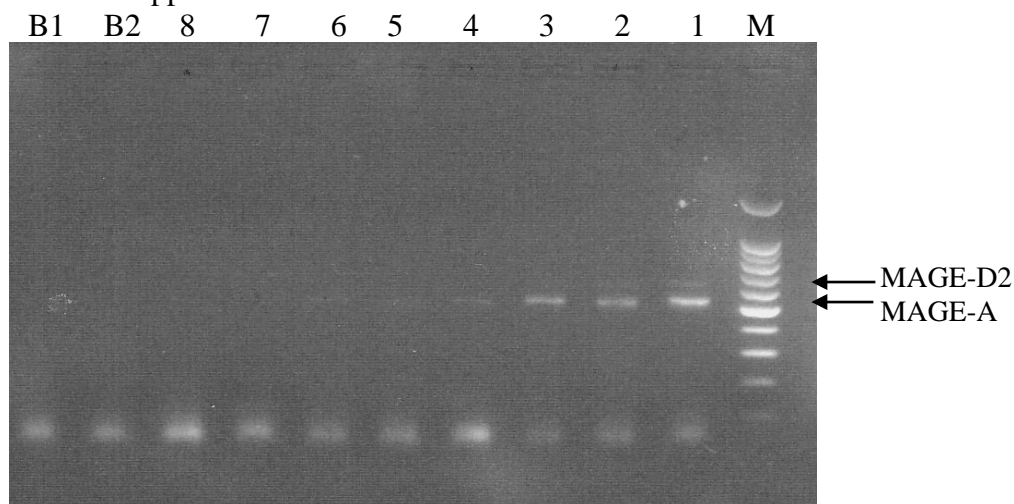


Figure 3.17

Profil électrophorétique d'amplicons obtenus à partir de différentes quantités d'ADNg. M : 100 bp DNA Ladder ; 1 et 2 : 60 ng d'ADNg ; 3 et 4 : 30 ng d'ADNg ; 5 et 6 : 3 ng d'ADNg ; 7 et 8 : 0,3 ng d'ADNg ; B1 : blanc pièce PCR 1 ; B2 : blanc pièce PCR 2

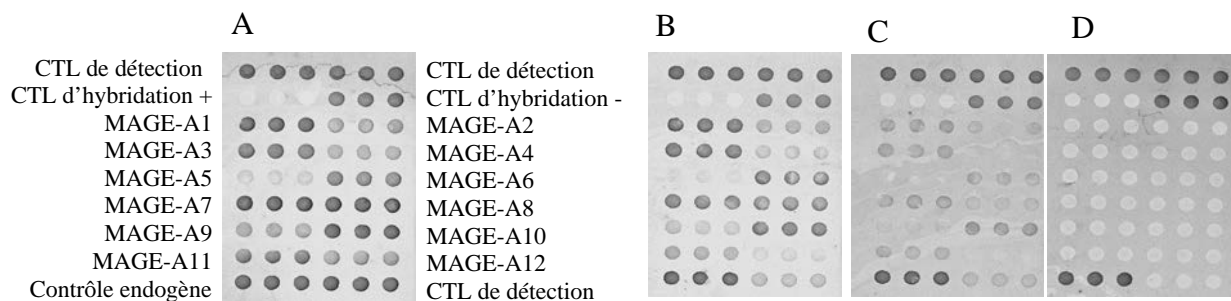


Figure 3.18

Détermination de la quantité limite d'ADNg pouvant contaminer l'échantillon sans engendrer de signaux faux positifs.

Hybridation d'amplicons obtenus à partir de différentes quantités d'ADNg.

A : 60 ng d'ADNg ; B : 30 ng d'ADNg ; C : 3 ng d'ADNg ; D : 0,3 ng d'ADNg.

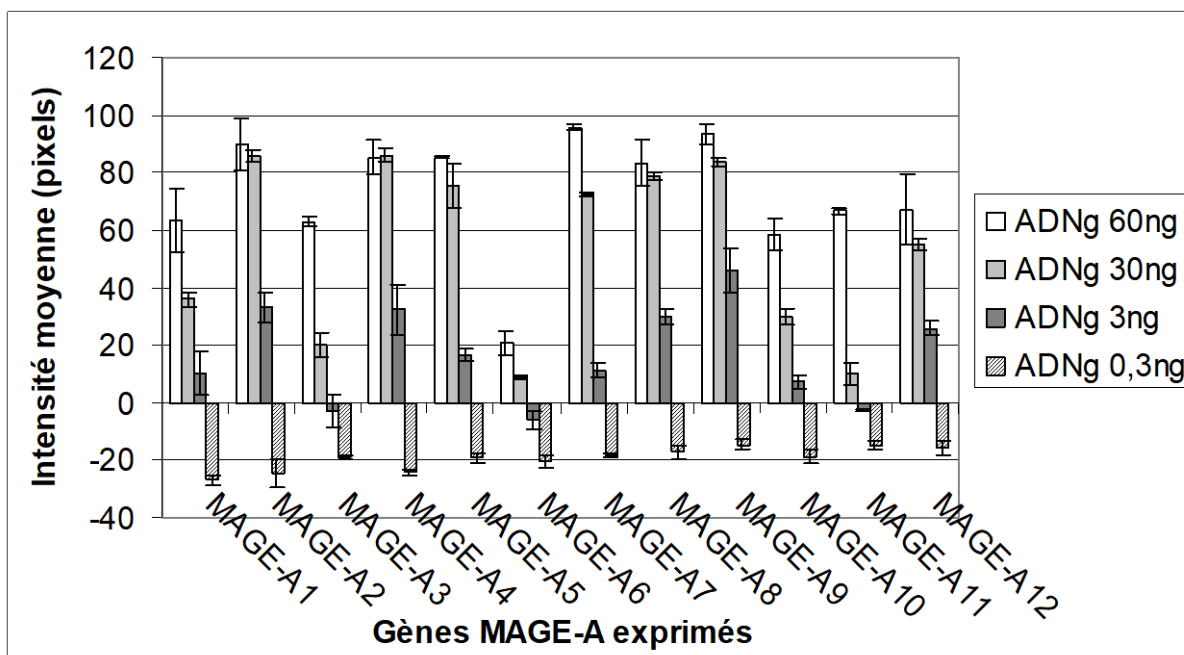


Figure 3.19

Quantification des signaux obtenus pour les damiers présentés à la figure 3.18. Les valeurs des intensités représentent la moyenne de trois réplicats pour chaque sonde capteur \pm deux déviations standard (SD).

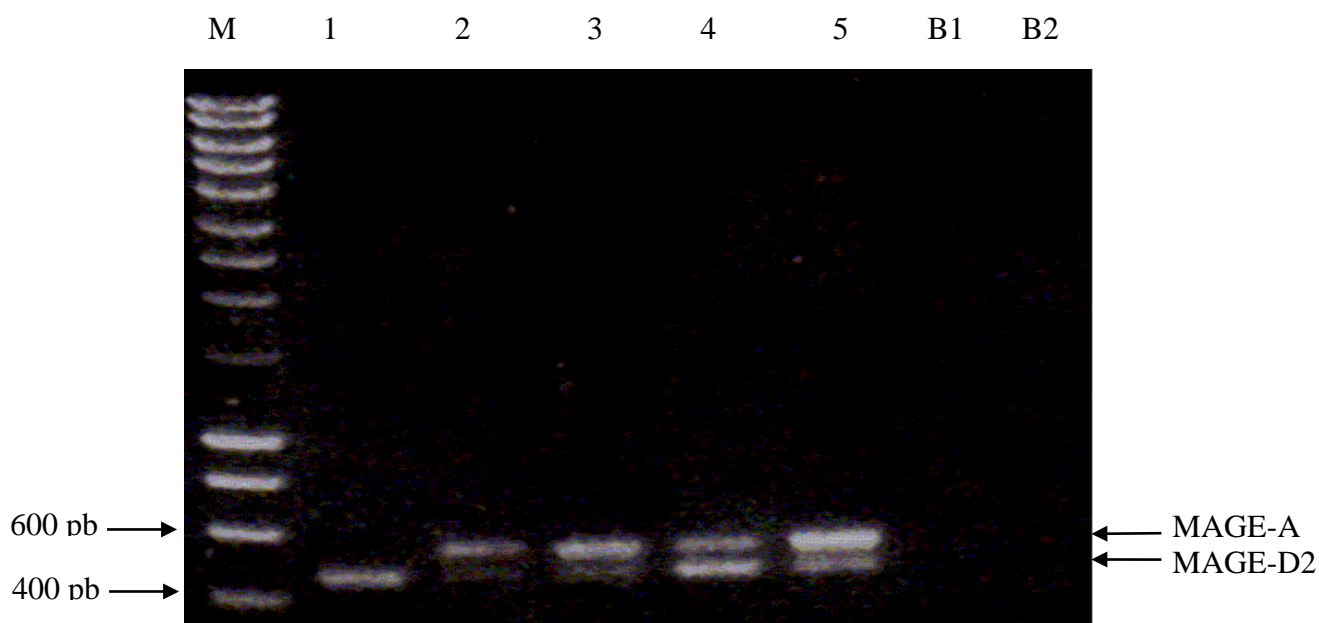


Figure 3.20

Profil électrophorétique d'amplicons obtenus pour 30 cycles de PCR à partir d'ADNc de différents échantillons de tissus tumoraux 1265 (recto-colique), 2337 et 2336 (sphère ORL), 2724 et 4109 (mélanomes). M : Smart Ladder ; 1 : 1265 ; 2 : 2336 ; 3 : 2337 ; 4 : 2724 ; 5 : 4109 ; B1 : blanc pièce PCR 1 ; B2 : blanc pièce PCR 2

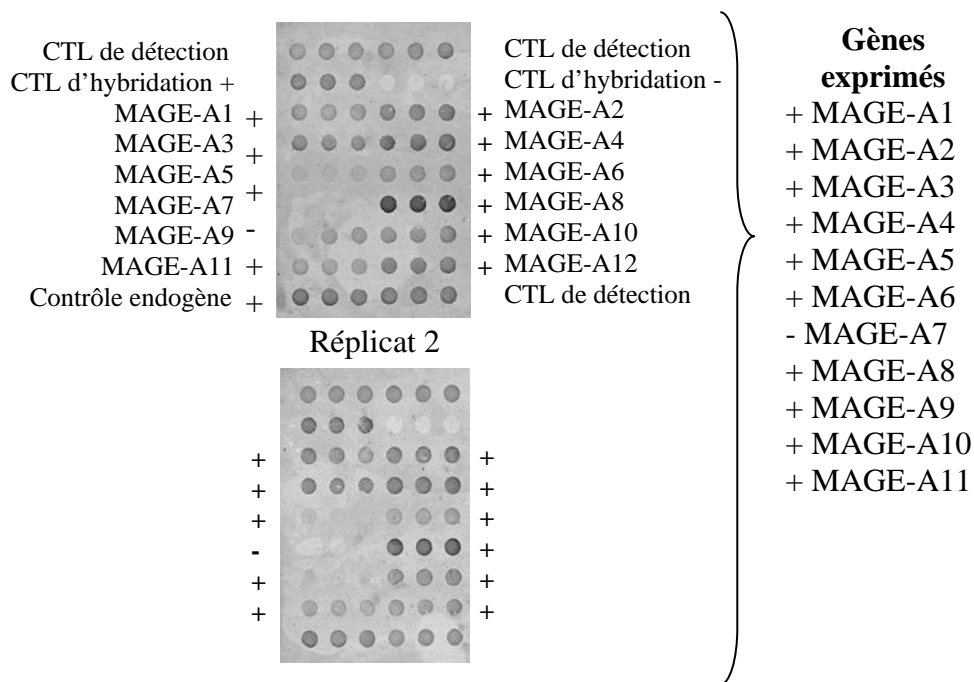


Figure 3.21

Analyse du pattern d'expression des gènes *MAGE-A*

Exemple pour l'échantillon 4109 amplifié par 30 cycles de PCR. Le programme de détection Imachips est utilisé pour déterminer les spots ayant atteint le seuil de détection.

Une sonde du damier est considérée positive lorsque le programme détecte deux spots sur trois et comme négative si moins de deux spots sont détectés. Le nombre de sondes positives dans les 2 réplicats nous informe sur l'expression du gène : +, forte ou modérée (sonde détectée dans deux damiers sur deux) ; (+), faible (sonde détectée dans un damier sur deux) ; - pas d'expression (aucune sonde détectée).

Tableau 3.6

Gènes *MAGE-A* exprimés

	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>	<i>A5</i>	<i>A6</i>	<i>A7</i>	<i>A8</i>	<i>A9</i>	<i>A10</i>	<i>A11</i>	<i>A12</i>
Tissus ^a tumoraux												
1265	^{b/-c/-d}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
2337	-/-	+/+/+	+/+/+	-/-	-/-	+/+/+	-/-	-/-	(+)/(+)/+	-/-	-/-	+/+/+
2336	+/+/+	(+/-)/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-	-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	<u>-/-/(+)</u>
2724	-/-	+/+/+	-/-	-/-	-/-	+/+/+	-/-	-/-	-/-	(+/-)/+	-/-	-/-
4109	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	(+/-)/+	+/+/+	-/-	+/+/+	<u>-/(+)/+</u>	+/+/+	+/+/+	+/+/+

^a Echantillons de tissus tumoraux : mélanomes (2724 et 4109), carcinome sphère ORL (2337 et 2336) et carcinome côlo-rectal (1265).

^b Expression des gènes *MAGE-A* déterminée par la méthode de référence de l'Institut Ludwig de Bruxelles, RT-PCR semi-quantitative avec des amorces spécifiques. Le niveau d'expression du gène est déterminé par comparaison de l'intensité de la bande obtenue après électrophorèse sur gel d'agarose par rapport à un ADNc de référence amplifié en parallèle : + = moyennement à fortement exprimé, (+) = faiblement exprimé, - = non exprimé. L'expression est relative au pourcentage trouvé dans les lignées cellulaires de référence MZ2-MEL pour *MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A5*, *A6*, *A10*, *A12* ; LB373-MEL pour *MAGE-A4*, *A9*, *A11* et TT (carcinome médullaire thyroïdienne) pour *MAGE-A8*.

^c Expression des gènes *MAGE-A* déterminée par RT-PCR (30 cycles) avec des amorces consensus et hybridation sur microdamier à ADN. L'expérience a été réalisée en double. L'expression d'un gène est calculée selon le nombre de microdamiers positifs pour ce gène comme décrit dans la légende de la figure 3.21 : +, forte ou modérée ; (+), faible ; -, pas d'expression détectée.

^d Expression des gènes *MAGE-A* déterminée par RT-PCR (35 cycles) avec des amorces consensus et hybridation sur microdamier à ADN. L'expérience a été réalisée en double. L'expression d'un gène est calculée selon le nombre de microdamiers positifs pour ce gène comme décrit dans la légende de la figure 3.21 : +, forte ou modérée ; (+), faible ; -, pas d'expression détectée.

Les discordances indiquées en gras correspondent aux gènes détectés faiblement par la méthode de référence de l'Institut Ludwig de Bruxelles qui sont détectés positifs sur microdamier après 35 cycles de PCR.

Les discordances soulignées correspondent aux gènes non détectés par la méthode de référence de l'Institut Ludwig de Bruxelles et qui sont détectés positif sur microdamier.

4. Bibliographie

- Alexandre, I., Hamels, S., Dufour, S., Collet, J., Zammattéo, N., De Longueville, F., Gala, J.L. and Remacle, J. (2001) Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Anal Biochem*, **295**, 1-8.
- Boel, P., Wildmann, C., Sensi, M.L., Brasseur, R., Renauld, J.C., Coulie, P., Boon, T. and van der Bruggen, P. (1995) BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity*, **2**, 167-175.
- Boon, T., Brichard, V. and Van den Eynde, B. (1995) Antigènes de rejet des tumeurs et immunothérapie spécifique du cancer. *médecine/sciences*, **11**, 1279-1287.
- Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P. and et al. (1994) A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, **180**, 35-42.
- De Backer, O., Arden, K.C., Boretto, M., Vantomme, V., De Smet, C., Czekay, S., Viars, C.S., De Plaen, E., Brasseur, F., Chomez, P., Van den Eynde, B., Boon, T. and van der Bruggen, P. (1999) Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res*, **59**, 3157-3165.
- De Backer, O., Verheyden, A.M., Martin, B., Godelaine, D., De Plaen, E., Brasseur, R., Avner, P. and Boon, T. (1995) Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes. *Genomics*, **28**, 74-83.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C. and et al. (1994) Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, **40**, 360-369.
- De Plaen, E., De Backer, O., Arnaud, D., Bonjean, B., Chomez, P., Martelange, V., Avner, P., Baldacci, P., Babinet, C., Hwang, S.Y., Knowles, B. and Boon, T. (1999) A new family of mouse genes homologous to the human MAGE genes. *Genomics*, **55**, 176-184.
- De Smet, C., Courtois, S.J., Faraoni, I., Lurquin, C., Szikora, J.P., De Backer, O. and Boon, T. (1995) Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene. *Immunogenetics*, **42**, 282-290.
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. and Boon, T. (1996) The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7149-7153.
- De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V. and Boon, T. (1999) DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol*, **19**, 7327-7335.
- De Smet, C., Lurquin, C., van der Bruggen, P., De Plaen, E., Brasseur, F. and Boon, T. (1994) Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene. *Immunogenetics*, **39**, 121-129.
- Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J.P., Van der Spek, C.W., Patard, J.J., Boon, T., Schrier, P. and Van den Eynde, B.J. (1996) A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics*, **44**, 323-330.
- Herin, M., Lemoine, C., Weynants, P., Vessiere, F., Van Pel, A., Knuth, A., Devos, R. and Boon, T. (1987) Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma. *Int J Cancer*, **39**, 390-396.
- Irvine, R.A. and Coetzee, G.A. (1999) Additional upstream coding sequences of MAGE-11. *Immunogenetics*, **49**, 585.

- Landry, C., Brasseur, F., Spagnoli, G.C., Marbaix, E., Boon, T., Coulie, P. and Godelaine, D. (2000) Monoclonal antibody 57B stains tumor tissues that express gene MAGE-A4. *Int J Cancer*, **86**, 835-841.
- Lethe, B., van der Bruggen, P., Brasseur, F. and Boon, T. (1997) MAGE-1 expression threshold for the lysis of melanoma cell lines by a specific cytotoxic T lymphocyte. *Melanoma Res*, **7 Suppl 2**, S83-88.
- Lucas, S. (2000) Identification de nouveaux gènes des familles MAGE et LAGE. *Faculté de Médecine, Institut Ludwig pour la recherche sur le cancer*. UCL.
- Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M.H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P.Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P.G., van der Bruggen, P. and Boon, T. (1999) Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*, **80**, 219-230.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Porschke, D. (1977) Elementary steps of base recognition and helix-coil transitions in nucleic acids. *Mol Biol Biochem Biophys*, **24**, 191-218.
- Rogner, U.C., Wilke, K., Steck, E., Korn, B. and Poustka, A. (1995) The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28. *Genomics*, **29**, 725-731.
- Ruault, M., Van Der Bruggen, P., Brun, M.E., Boyle, S., Roizes, G. and Sario, A.D. (2002) New BAGE (B melanoma antigen) genes mapping to the juxtacentromeric regions of human chromosomes 13 and 21 have a cancer/testis expression profile. *Eur J Hum Genet*, **10**, 833-840.
- Serrano, A., Lethe, B., Delroisse, J.M., Lurquin, C., De Plaen, E., Brasseur, F., Rimoldi, D. and Boon, T. (1999) Quantitative evaluation of the expression of MAGE genes in tumors by limiting dilution of cDNA libraries. *Int J Cancer*, **83**, 664-669.
- Takahashi, K., Shichijo, S., Noguchi, M., Hirohata, M. and Itoh, K. (1995) Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res*, **55**, 3478-3482.
- Turner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Brocker, E.B., Steinman, R.M., Enk, A., Kampgen, E. and Schuler, G. (1999) Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med*, **190**, 1669-1678.
- Van den Eynde, B., Hainaut, P., Herin, M., Knuth, A., Lemoine, C., Weynants, P., van der Bruggen, P., Fauchet, R. and Boon, T. (1989) Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL. *Int J Cancer*, **44**, 634-640.
- Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S. and Boon, T. (1995) A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med*, **182**, 689-698.
- Van den Eynde, B.J. and van der Bruggen, P. (1997) T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, **9**, 684-693.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T. (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, **254**, 1643-1647.

- Wetmur, J.G. (1991) DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **26**, 227-259.
- Zammatteo, N., Hamels, S., De Longueville, F., Alexandre, I., Gala, J.L., Brasseur, F. and Remacle, J. (2002a) New chips for molecular biology and diagnostics. *Biotechnol Annu Rev*, **8**, 85-101.
- Zammatteo, N., Lockman, L., Brasseur, F., De Plaen, E., Lurquin, C., Lobert, P.E., Hamels, S., Boon, T. and Remacle, J. (2002b) DNA microarray to monitor the expression of MAGE-A genes. *Clin Chem*, **48**, 25-34.